

# INAUGURAL-DISSERTATION

Zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplombiologin Mieun Lee  
aus Wiesbaden

Tag der mündlichen Prüfung:

Serologische Identifizierung  
von Tumorantigenen  
des kutanen T-Zell Lymphoms  
mit Fokus auf  
Plasmamembranproteine

Gutachter: Prof. Dr. Claus Hobe Schröder  
PD Dr. Stefan Eichmüller

Bei

Dr. Stefan Eichmüller,

Professor Dr. Claus Hobe Schröder,

Professor Dr. Thomas Rausch und Dr. Karsten Rippe,

Nicole, Tanja, Anita, Elke, Sascha, Fang, Andreas und Nadine,

Eva, Tine und Michi,

Claudia und Suzin,

Annina,

Till

und meiner Familie

möchte ich mich herzlich bedanken.

## INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG.....	7
1. EINLEITUNG.....	9
1.1. Kutane Lymphome.....	9
1.2. Mycosis fungoides und das Sézary Syndrom.....	10
1.3. Stadien der kutanen T-Zell Lymphome.....	10
1.4. Pathogenese der kutanen T-Zell Lymphome.....	12
1.5. Behandlung von kutanen T-Zell Lymphomen.....	15
1.6. Antikörpertherapien.....	17
1.7. Antikörpertherapie-Ansätze bei CTCL.....	22
1.8. Tumorspezifische Plasmamembranproteine bei CTCL.....	22
1.9. Ziel der Arbeit.....	24
2. MATERIAL UND METHODEN.....	26
Chemikalien.....	26
2.1. Zellkultur.....	28
2.2. Plasmamembran-Anreicherung.....	30
2.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot.....	32
2.4. Immunisierung zweier Kaninchen mit HuT78-Oberflächenpräparat.....	36
2.5. Test der Seroreaktivität mittels ELISA.....	37
2.6. Immunzytochemie.....	39
2.7. Immunpräzipitation.....	41
2.8. SEREX (Serological identification of antigens by recombinant expressed cloning).....	44
2.9. Sequenzierung von DNA.....	52
2.10. Isolierung von „Lipid rafts“.....	53
2.11. RNA Isolierung und reverse Transkription.....	55
2.12. Klassische PCR.....	57
2.13. Quantitative Real-time PCR.....	58
2.14. Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts.....	61
2.15. Isolierung von CD4+ T-Zellen aus PBMC.....	62
3. ERGEBNISSE.....	63
3.1. Über eine Plasmamembran-Anreicherung wurde ein Oberflächenpräparat der kutanen T-Zell Lymphomlinie HuT78 hergestellt, das als Antigengemisch dienen sollte.....	63
3.2. Generierung von Kaninchenseren gegen Proteine des HuT78-Oberflächenpräparats.....	67

---

3.3. Die Kaninchenserum reagieren spezifisch mit Oberflächen-Proteinen von HuT78-Zellen.....	69
3.4. Proteine des Oberflächenpräparats, die von Kaninchen-Antikörpern immunpräzipitiert wurden: Identifizierung des Vorläuferproteins des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 .	74
3.5. Die Analyse einer cDNA Phagenbank mit den Kaninchenserum identifiziert neben Plasmamembran- auch Nicht-Plasmamembranproteine .....	81
3.6. Bei Zellen der kutanen T-Zell Lymphomlinie HuT78 ist das Nicht-Plasmamembranprotein Ku86 auch Teil von „Lipid rafts“ .....	89
3.7. Beim kutanen T-Zell Lymphom wurde eine von Normalzellen abweichende Transkriptionshöhe von hZimp10, FOXM1 und MT5-MMP nicht aber von Integrin $\alpha 4$ gefunden .....	93
3.8. Das Plasmamembranprotein MT5-MMP weist beim kutanen T-Zell Lymphom ein von Normalzellen abweichendes Reifungsmuster auf .....	99
4. DISKUSSION .....	102
4.1. Die Verwendung reaktiver Kaninchenserum gegen ein CTCL-Oberflächenpräparat in der Suche nach tumorspezifischen Proteinen.....	102
4.2. Immunpräzipitation als erste Möglichkeit für die Identifizierung von Proteinen, gegen die die Kaninchenserum reaktiv sind.....	104
4.3. Serologische Analyse einer cDNA-Bank als zweite Möglichkeit für die Identifizierung von Proteinen.....	108
4.4. Ausblick .....	117
5. LITERATUR.....	119
6. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN .....	128
7. ANHANG 1.....	129
8. ANHANG 2.....	131

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abl	<u>A</u> belson Onkogen
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität ( <u>a</u> ntibody- <u>d</u> e <u>p</u> endent <u>c</u> ellular cytotoxicity)
Ak	<u>A</u> ntik <u>ö</u> rper
AP	<u>A</u> lkalische <u>P</u> hosphatase
APC	Antigen präsentierende Zelle ( <u>a</u> ntigen <u>p</u> resenting <u>c</u> ells)
ARS	<u>A</u> minoacyl-t <u>R</u> NA- <u>S</u> ynthetase
ATP	<u>A</u> denosin- <u>T</u> riphosphat
Bcl2	<u>B</u> - <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma/leukaemia- <u>2</u>
Bp	<u>B</u> asen <u>p</u> aare
B-Zelle	Lymphozyte, die im Knochenmark entsteht ( <u>b</u> one marrow cell)
CBCL	kutanen B-Zell Lymphom ( <u>c</u> utaneous <u>b</u> - <u>c</u> ell <u>l</u> ymphoma)
CCT	<u>C</u> haperonin <u>c</u> ontaining <u>T</u> CP-1
CD	Differenzierungsantigene ( <u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation)
CDC	Komplement-abhängige Zytotoxizität ( <u>c</u> omplement- <u>d</u> e <u>p</u> endent cytotoxicity)
cDNA	<u>C</u> opy <u>D</u> NA
CEA	<u>C</u> arcino <u>e</u> mbryonales <u>A</u> ntigen
CLA	Kutanes Lymphozyten Antigen ( <u>c</u> utaneous lymphocyte <u>a</u> ntigen)
CLL	<u>C</u> hronische <u>l</u> ymphatische <u>L</u> eukämie
CML	<u>C</u> hronische <u>m</u> yeloische <u>L</u> eukämie
c-myb	<u>M</u> yeloblastosis Onkogen
c-myc	<u>M</u> yelocytomatosis Onkogen
Cou-L3	CTCL-Zelllinie aus einem Patienten mit pleomorphem großzelligem T-Zell Lymphom
cTAGE	<u>C</u> utaneous <u>T</u> -cell lymphoma <u>a</u> ssociated <u>g</u> ene
CTCL	Kutanes T-Zell Lymphom ( <u>c</u> utaneous <u>T</u> - <u>c</u> ell lymphoma)
CTLA	Zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Protein-4 ( <u>c</u> ytotoxic <u>T</u> -cell lymphocyte <u>a</u> ssociated protein- <u>4</u> )
Cys	<u>C</u> ystein
Da	<u>D</u> alton (Masse-Einheit)

---

ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	<u>D</u> ideoxynukleosid- <u>T</u> riphosphat
dH <sub>2</sub> O	einmal destilliertes Wasser
dNTP	<u>D</u> eoxynukleosid- <u>T</u> riphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <u>D</u> esoxyribunucleic <u>a</u> cid)
E. coli	<u>E</u> scherichia <u>c</u> oli
ELISA	<u>E</u> nzyme- <u>l</u> inked immunosorbant assay
ESI-MS/MS	<u>E</u> lectrospray ionization- <u>m</u> ass spectrometry
FDA	<u>F</u> ood and <u>d</u> rug <u>a</u> dministration
FOXP/M	<u>F</u> orkhead <u>b</u> ox P/M (Transkriptionsfaktor)
GAPDH	<u>G</u> lycerin- <u>A</u> ldehyd 3- <u>P</u> hosphat- <u>D</u> ehydrogenase
Grb2	<u>G</u> rowth-factor-receptor <u>b</u> inding protein <u>2</u>
GTP	<u>G</u> uanosin- <u>T</u> riphosphat
HER2/neu	<u>h</u> uman <u>e</u> pidermal growth <u>r</u> eceptor <u>2</u>
HH	CTCL-Zelllinie aus einem Patienten mit aggressivem T-Zell Lymphom
HLA	<u>h</u> umanes <u>L</u> eukozyten <u>A</u> ntigen
HMBS	<u>H</u> ydroxymethyl- <u>B</u> ilane <u>S</u> ynthase
Hsp70	<u>H</u> itzeschock- <u>P</u> rotein <u>70</u>
HuT78	CTCL-Zelllinie aus einem Patienten mit Sézary Syndrom
hZimp10	<u>h</u> uman <u>z</u> inc finger-containing, <u>M</u> iz1, <u>P</u> IAS-like protein of chromosome <u>10</u>
ICAM-1	<u>i</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule- <u>1</u>
IgE/G	<u>I</u> mmunglobulin Typ E/G
Jak	früher <u>J</u> ust <u>a</u> nother <u>K</u> inase, jetzt <u>J</u> anus <u>K</u> inase
Kb	<u>K</u> ilobasen
KIR	<u>k</u> iller immunoglobulin-like <u>r</u> eceptor
LB	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani
LFA-1	<u>L</u> ymphozyten <u>F</u> unktions-assoziertes <u>A</u> ntigen- <u>1</u>
LPAM-1	lymphocyte <u>P</u> eyer's patch <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule- <u>1</u>
M	Mol
MALDI-TOF	<u>M</u> atrix-assisted <u>l</u> aser <u>d</u> esorption ionization- <u>t</u> ime <u>o</u> f <u>f</u> light
MF	<u>M</u> ycosis <u>f</u> ungoides
MHC	<u>M</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex
MMLV	<u>M</u> oloney <u>m</u> urine <u>l</u> eukemia <u>v</u> irus
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> NA

---

MT5-MMP	<u>M</u> embrane- <u>t</u> ype <u>5</u> <u>m</u> atrix <u>m</u> etallo <u>p</u> roteinase
Muc1	Mitglied der Muzin-Familie
MyLa	CTCL-Zelllinie aus einem Patienten mit Mycosis fungoides
NFκB	<u>N</u> uclear <u>f</u> actor for <u>κ</u> B
NHL	<u>N</u> on- <u>H</u> odgkin <u>L</u> ymphom
NTP	<u>N</u> ucleosid-5'- <u>T</u> riphosphat
OD	<u>o</u> ptische <u>D</u> ichte
ORF	<u>o</u> pen <u>r</u> eadin <u>g</u> <u>f</u> ra <u>m</u> e
PBL	<u>P</u> eriphere <u>B</u> lutlymphozyten
PBMC	Periphere Blutmononukleäre Zellen (peripheral <u>b</u> lood <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells)
PBS	<u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PIAS	<u>p</u> rotein <u>i</u> nhibitor of <u>a</u> ctivated <u>S</u> TAT
PM	<u>P</u> lasma <u>m</u> embran
PUVA	<u>P</u> sorale <u>n</u> - <u>U</u> V <u>A</u> -Licht(therapie)
Ras	<u>r</u> at <u>s</u> arcoma Onkogen
RNA	Ribonukleinsäure ( <u>r</u> ibu <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
Rpm	<u>r</u> ounds <u>p</u> er <u>m</u> inute
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute Medium
rRNA	<u>r</u> ibosomale <u>R</u> NA
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur
SDS-PAGE	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate <u>p</u> oly <u>a</u> crylamide <u>g</u> el <u>e</u> lectrophoresis
SeAx	CTCL-Zelllinie aus einem Patienten mit Sézary Syndrom
SEREX	<u>S</u> erological identification of antigens by <u>r</u> ecombinant <u>e</u> xpression cloning
STAT	<u>s</u> ignal <u>t</u> ransducer and <u>a</u> ctivator of <u>t</u> ranscription
SUMO	<u>s</u> mall <u>u</u> biquitin-like <u>m</u> odifier
SzS	<u>S</u> ézary <u>S</u> yndrom
Tal-1	auch bekannt als stem cell leukemia gene (SCL)
TCP-1	<u>T</u> -complex polypeptide-1
TCR	T-Zell Rezeptor ( <u>T</u> -cell <u>r</u> eceptor)
TGF-β	<u>T</u> ransforming <u>G</u> rowth <u>F</u> actor <u>β</u>
Tyr	<u>T</u> yrosin
T-Zelle	Lymphozyte, die im Thymus reift ( <u>t</u> hymus cell)
U	Units



---

ÜN	<u>ü</u> ber <u>N</u> acht
UV	<u>U</u> ltraviolett
VCAM-1	vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül-1 ( <u>v</u> ascular <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule- <u>1</u> )
ZF	<u>Z</u> entrifugation
ZNS	<u>z</u> entrales <u>N</u> ervensystem

## ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, Plasmamembranproteine zu finden, die spezifisch für die kutane T-Zell Lymphome (CTCL), Sézary Syndrom (SzS) und Mycosis fungoides (MF), sind. Zu ihrer Identifizierung wurde zunächst über differentielle Zentrifugation ein Oberflächenpräparat der CTCL-Zelllinie HuT78 hergestellt. Es diente als Antigengemisch für die Immunisierung von Kaninchen. Die gewonnenen polyvalenten Antiseren reagierten in ELISA- und Western Blot Analysen spezifisch mit Proteinen des Oberflächenpräparats. Ferner zeigte eine immunzytochemische Analyse, dass sie die Oberfläche nativer HuT78-Zellen erkannten. Für die eigentliche Identifizierung von Plasmamembranproteinen wurden die Kaninchen-Antiseren zunächst in der Immunpräzipitation eingesetzt. Dabei wurde unter den präzipitierten Proteinen auch das Vorläuferprotein des plasmamembranständigen ICAM-1 identifiziert. Ihren zweiten Einsatz hatten die Kaninchenserum in einer serologischen Analyse, bei der eine cDNA-Phagenbank der CTCL-Zelllinie SeAx nach reaktiven Klonen durchsucht wurde. Hierbei wurden neben Plasmamembran- auch viele Nicht-Plasmamembranproteine identifiziert. Aufgrund ihrer Lokalisation und Funktion bei diversen Tumoren wurden aus 42 identifizierten Proteinen fünf für eingehendere Expressions-Analysen ausgewählt: Ku86, ein Mitglied eines DNA-Reparatur-Komplexes; hZimp10, ein Ko-Aktivator des Androgen-Rezeptors; FOXM1, ein in Embryonalgewebe ubiquitär auftretender Transkriptionsfaktor; MT5-MMP, eine im Abbau von extrazellulärer Matrix involvierte Proteinase und das Adhäsionsprotein Integrin  $\alpha 4$ . Western Blot Analysen zeigten, dass Ku86 bei HuT78-Zellen auch Teil von „Lipid rafts“, cholesterinreichen Membrandomänen mit signalübertragenden Proteinen, sein kann. Real-time PCR Analysen zielten darauf ab, die Expression von hZimp10, FOXM1, MT5-MMP und Integrin  $\alpha 4$  in Haut- und PBMC-Proben von CTCL-Patienten mit entsprechenden Kontroll-Proben zu vergleichen. Dabei wurde eine gegenüber Normalzellen erniedrigte Transkripthöhe von hZimp10 bei CTCL beobachtet. Desweiteren konnte eine Expression von FOXM1 ausschließlich in Proben von SzS-Patienten gezeigt werden. Im Vergleich zu Nicht-Tumorproben wurden in CTCL-Proben für Integrin  $\alpha 4$  gleiche Transkripthöhen und für MT5-MMP in den Hautproben der MF-Patienten erniedrigte Transkripthöhen bestimmt. Auf Proteinebene wurde darüber hinaus für das kutane T-Zell Lymphom ein von Normalzellen abweichendes Reifungsmuster von MT5-MMP beobachtet. Vor allem waren die löslichen, aktiven Formen der Matrix Metalloproteinase in niedrigeren Mengen vorhanden bzw. gänzlich abwesend in den CTCL-Proben. Aus der Arbeit resultierend, könnten eingehendere „Lipid raft“-Analysen von CTCL-Zellen zum Auffinden von tumorspezifischen Plasmamembranproteinen beitragen.

## SUMMARY

This thesis attempted to identify specific plasma membrane proteins of the cutaneous T-cell lymphomas (CTCL), the Sézary syndrome (SzS) and mycosis fungoides (MF), which could serve as targets for therapeutic antibodies. Therefore, a plasma membrane enriched fraction of CTCL cell line HuT78 was achieved by differential centrifugation which was then used for immunization of rabbits. Reactivity of the antisera was checked in an ELISA-system as well as by Western blot, proving reactivity against the plasma membrane fraction. Furthermore, immunocytochemical analyses could show that the rabbit sera reacted against the plasma membrane of native HuT78 cells. For the identification of plasma membrane proteins the antisera were first applied in immunoprecipitation. The identification of precipitated proteins revealed the precursor of the plasma membrane protein ICAM-1. Secondly, a serological screening of a CTCL cell line cDNA library by using the rabbit antisera was performed by a modified SEREX method. This resulted in plasma membrane and numerous non-plasma membrane proteins. According to literature researches, 5 of 42 different proteins were preselected due to their localization and function in various tumor types for further expression analyses: Ku86, a member of a DNA-repair complex; hZimp10, a co-activator of androgen receptor; FOXM1, a transcription factor ubiquitously expressed in embryonic tissue; MT5-MMP, a proteinase responsible for degradation of extracellular matrix and the adhesion protein Integrin  $\alpha 4$ . Lipid rafts analysis revealed a novel localization of Ku86 in these cholesterol-rich subdomains of CTCL cells, which harbor important receptors for signal transduction. Real-time PCR analyses were performed to compare the transcription levels of hZimp10, FOXM1, MT5-MMP and integrin  $\alpha 4$  in skin- and PBMC-probes of CTCL-patients with those of healthy persons and patients with benign inflammatory skin diseases. The nuclear protein hZimp10 showed a decreased expression level in CTCL, whereas transcription factor FOXM1 was found to be only expressed in tumor cells of Sézary syndrome patients. The plasma membrane protein integrin  $\alpha 4$  showed no different transcript amounts in CTCL. MT5-MMP was found to be decreased in probes of mycosis fungoides patients compared to those of healthy persons. Furthermore, by Western blotting there is evidence that MT5-MMP exhibits an aberrant maturation profile in CTCL. The results showed decreased amounts of soluble, active forms of MT5-MMP in CTCL compared the healthy controls. With regard to the results, a more detailed analysis of lipid rafts of CTCL cells could help finding tumorspecific plasma membrane proteins.

# 1. EINLEITUNG

Tumorzellen können unkontrolliert proliferieren. Sie haben Eigenschaften erworben, mit denen sie ohne Einschränkungen wachsen können, wohingegen normale Zellen in ihrem Wachstum reguliert sind. Tumorzellen lassen sich nicht mehr durch Zellzyklusregulatoren, örtliche Barrieren oder durch das eigene Immunsystem daran hindern sich auszubreiten und zu metastasieren. Oft verlieren sie die Charakterzüge des Zelltyps, aus dem sie ursprünglich entstanden sind. Die Ursachen scheinen hierfür nicht an einem einzelnen Ereignis zu liegen.

Auch das Abwehrsystem des Körpers, das Immunsystem, kann selbst Entstehungsort eines Tumors sein. Bei Leukämien entarten hämatopoietische Zellen unreifer Stadien und können wie normale Blutzellen in Gefäßen über den ganzen Körper verteilt sein. Tumorzellen des lymphatischen Systems fallen unter die Kategorie der Lymphome, die neoplastische Zellen auch in ausgereiften Stadien umfassen und oft örtlich begrenzt sind (z. B. Knochenmark, Lymphknoten oder Haut). Sie lassen sich einteilen in Morbus Hodgkin und die Non-Hodgkin Lymphome. Zu den Non-Hodgkin Lymphomen gehören auch die in dieser Arbeit fokussierten kutanen Lymphome.

## 1.1. Kutane Lymphome

Wie andere Organe kann auch die Haut von malignen Lymphomen befallen werden. Kutane Lymphome unterscheiden sich dabei in ihrer Primärmanifestierung. Sekundär kutane Lymphome manifestieren sich zunächst im extrakutanen Bereich, bevor sie die Haut erreichen. Zu ihnen gehören chronisch lymphatische Leukämien (CLL), chronisch myeloische Leukämien (CML) und akute Leukämien. Im Unterschied zu ihnen wird eine lymphoproliferative Hautinfiltration zu der Gruppe der primär kutanen Lymphome gezählt, wenn sie auch nach sechs Monaten ausschließlich in der Haut zu finden ist. Primär kutane Lymphome lassen sich in kutane T-Zell (CTCL), B-Zell (CBCL) und unklassifizierbare Lymphome einteilen.

Die **kutanen T-Zell Lymphome** sind der Gegenstand dieser Arbeit und bilden eine sehr heterogene Gruppe von niedrig bis mittelgradig malignen Non-Hodgkin Lymphomen. Zu den klassischen Formen zählen die Mycosis fungoides und das Sézary Syndrom. Sie machen zusammen 45% aller kutanen Lymphome aus.

## 1.2. Mycosis fungoides und das Sézary Syndrom

Die **Mycosis fungoides** (MF) ist ein chronisch verlaufendes Lymphom, dessen Ausbreitung zunächst auf die Haut beschränkt ist. Der Krankheitsverlauf ist anfangs meist schmerzfrei. Sie kann über ein Stadium mit patch- über plaqueartigen Flecken, gefolgt von Geschwüren, schließlich nach Jahren in das Tumorstadium übergehen. Später können auch andere Orte wie Knochenmark, Leber, Milz, Brust oder ZNS befallen sein (Goerdts et al., 1996). MF im Patch/Plaque Stadium wird oft als eine chronische Kontakt- oder eine atopische Dermatitis (entzündliche Hautreaktion) oder als Psoriasis (Schuppenflechte) fehldiagnostiziert. Die Patienten entwickeln oft eine Hypopigmentierung und Atrophie (Gewebeschwund). Zu den histologischen Kriterien für eine Mycosis fungoides zählen die epidermalen Ansammlungen von Lymphomzellen mit Langerhans-Zellen, die sogenannten Darier-Pautrier-Mikroabszesse.

Das **Sézary Syndrom** (SzS) wird als die leukämische und aggressivere Variante der MF bezeichnet. Häufig erkranken auch Patienten am Sézary Syndrom ohne vorher eine MF zu entwickeln. Hier werden pleomorphe, zirkulierende und hyperchromatische Tumorzellen mit zerebriformen Zellkernen (Sézary Zellen) auch im peripheren Blut gefunden, die mehr als 80% der peripheren Blutlymphozyten ausmachen können. Das klinische Bild unterscheidet sich äußerlich von der Mycosis fungoides durch eine diffuse Erythrodermie (Rötung und Schuppung der Haut), generalisierte Lymphadenopathie (Schwellung der Lymphknoten), lederartige und geschwollene Haut, Hyperkeratose der Handflächen und Fußsohlen (überschießende Verhornung), Hyper- oder Hypopigmentationen, Haarausfall und Temperaturdysregulationen.

Im pathohistologischen Tumorbild unterscheiden sich beide malignen Krankheiten nicht voneinander.

## 1.3. Stadien der kutanen T-Zell Lymphome

Die Stadien der kutanen T-Zell Lymphome werden mit Hilfe der TNM-Klassifikation eingeteilt. Sie ist eine internationale Stadieneinteilung nach der Ausbreitung der Tumore (Tumor, Nodus (Lymphknoten), Metastasen). Durch Zuordnung von Indexzahlen werden die einzelnen Ausbreitungszahlen genauer beschrieben. Allerdings wurde sie für CTCL vor allem für Mycosis fungoides zugeschnitten und hilft daher nur bedingt bei der Diagnose und Prognose anderer CTCL-Formen weiter.

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation der kutanen Lymphome (www.ado-homepage.de)**

<b>TNM-Klassifikation der kutanen Lymphome (Kerl und Sterry 1987)</b>	
<b>T: Haut</b>	
<b>T0</b>	Klinisch und/oder histologisch verdächtige Veränderungen
<b>T1</b>	Ekzematöse Herde, Plaques: <10% Körperoberfläche
<b>T2</b>	Ekzematöse Herde, Plaques: >10% Körperoberfläche
<b>T3</b>	Tumoren (mehr als einer)
<b>T4</b>	Erythrodermie
<b>N: Lymphknoten</b>	
<b>N0</b>	Klinisch keine Lymphknoten palpabel
<b>N1</b>	Palpable Lymphknoten; histologisch kein Anhalt für CTCL
<b>N2</b>	Klinisch keine palpable Lymphknoten; histologisch Infiltrate eines T-Zell-Lymphoms
<b>N3</b>	Palpable Lymphknoten; histologisch Infiltrate eines T-Zell Lymphoms
<b>B: Peripheres Blut</b>	
<b>B0</b>	Keine atypischen Lymphozyten im peripheren Blut (<5%)
<b>B1</b>	Atypische Lymphozyten im peripheren Blut (>5%)
<b>M: Viszerale Organe</b>	
<b>M0</b>	Keine Beteiligung viszeraler Organe
<b>M1</b>	Histologisch gesicherte viszerale Beteiligung

**Tabelle 2: Auf der TNM-Klassifikation basierende Stadiengruppierung (www.onkodin.de)**

<b>Stadiengruppierung (Kerl und Sterry 1987)</b>			
Stadium	T	N	M
<b>IA</b>	T1	N0	M0
<b>IB</b>	T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T1, T2	N1	M0
<b>IIB</b>	T3	N0, N1	M0
<b>III</b>	T4	N0, N1	M0
<b>IVA</b>	jedes T	N2, N3	M0
<b>IVB</b>	jedes T	jedes N	M1

Im weiteren Verlauf der Einleitung werden ausschließlich die kutanen T-Zell Lymphome Mycosis fungoides und Sézary Syndrom behandelt. Da wie bereits erwähnt MF und SzS sich pathohistologisch nicht voneinander unterscheiden lassen, werden von nun an beide Tumorformen gruppiert unter dem Begriff des kutanen T-Zell Lymphoms oder auch kurz CTCL behandelt.

## 1.4. Pathogenese der kutanen T-Zell Lymphome

### *1.4.1. Die meisten kutanen T-Zell Lymphome bestehen aus epidermotropen T<sub>H</sub>2-Zellen*

Allgemein zeichnen sich Tumorzellen durch i) eine atypische Morphologie, ii) veränderte Differenzierung und iii) monoklonale Proliferation aus. Diese Kriterien erfüllen auch Tumorzellen des CTCLs. i) Sie haben einen zerebriform aussehenden Zellkern, ii) einen Phänotyp reifen, aktivierten T-Helferzellen, T<sub>H</sub>2, des Memory-Typs mit den Differenzierungsantigenen CD3, CD4, CD45RO und dem kutanen Lymphozyten-Antigen (CLA) (Vowels et al., 1994) und iii) Untersuchungen zeigten ein monoklonales Rearrangement des T-Zell Rezeptors, das einen Hinweis auf die Entwicklung des Tumors aus einer Zelle gibt (Dippel et al., 2003). Neben CD4 positiven Tumorzellen sind auch seltene CTCL-Formen mit CD8 positiven Tumorzellen beobachtet worden (Rook and Heald, 1995), deren Krankheitsverlauf aggressiver und durch viszerale Metastasen ausgezeichnet ist. Andere Studien zeigten, dass nicht alle CTCL-Zellen einen T-Zell Rezeptor mit einer Alpha- und einer Beta-Kette, sondern das seltenere Heterodimer aus einer Gamma- und Delta-Kette besaßen. Diese Tumorzellen waren zusätzlich auch CD4 und CD8 negativ (Asadullah et al., 1996; Bagot et al., 2001a).

Ein besonderes Charakteristikum des CTCL ist der Epidermotropismus der Tumorzellen. Unter dem Begriff des Epidermotropismus versteht man das Wandern von Zellen in die Epidermis. Es scheint sich hierbei um einen komplexen Vorgang zu handeln, der nicht allein durch einen Faktor zu begründen ist. Skin-Homing Rezeptoren wie das kutane Lymphozyten-Antigen (CLA) und das Lymphozyten Funktions-assoziierte Antigen-1 (LFA-1) und chemotaktische Faktoren wie das Interferon-induzierbare Protein-1 (IP-10) und das IFN- $\gamma$ -induzierte Monokin (Mig) werden als mitverantwortlich gesehen (Rook and Heald, 1995; Tensen et al., 1998).

### *1.4.2. Mögliche Ursachen viraler, genetischer oder umweltbedingter Natur*

Mit größter Wahrscheinlichkeit resultiert die Ätiologie und Tumorgenese des CTCL aus verschiedenen und teilweise voneinander unabhängigen Prozessen. Anfangs wurde als eine mögliche Ursache eine Infektion mit dem humanen T-Zell Leukämie Virus-1 (HTLV-1) diskutiert. Allerdings waren die Ergebnisse der verschiedenen Studien kontrovers, so dass keine sichere Assoziation mit diesem Virus gezeigt werden konnte (Hall et al., 1991; Khan et al., 1996). Andere Studien befassten sich mit möglichen genetischen Ursachen wie chromosomalen Aberrationen. Allerdings erwiesen sie sich alle bislang als unspezifisch

(Shapiro et al., 1987). Eine Studie beschäftigte sich mit Berufsgruppen in der petrochemischen, Textil oder Metall verarbeitenden Industrie, die einen überdurchschnittlichen Anteil der Patienten bilden und möglicherweise für CTCL prädestiniert sein könnten (Greene et al., 1979). Vor allem Patienten mit Ekzem-Erkrankungen der Haut wiesen eine erhöhte CTCL-Erkrankung auf, was auch mit der Meinung einhergeht, dass sich aus Parapsoriasis oder Dermatitis CTCL entwickeln kann (Tuyp et al., 1987). Immer noch gilt allgemein die Hypothese einer chronischen Antigenstimulation als Ursache für CTCL, wobei die Natur des präsentierten Antigens noch nicht bekannt ist (Tan et al., 1974; Edelson, 1980).

#### ***1.4.3. Veränderte Immunbiologie und genetische Mutationen***

Die bislang untersuchten pathogenetischen Faktoren des CTCL können nach zwei Aspekten eingeteilt werden: Einerseits nach der veränderten Immunbiologie und andererseits nach genetischen Mutationen.

Maligne Zellen des CTCL haben das Zytokin-Sekretionsprofil eines aktivierten T-Helferzelltyps (Vowels et al., 1994; Asadullah et al., 1996; Dummer et al., 1996; Buhl and Sogaard, 1997). Die Konzentration an Interleukin-5 und Interleukin-10 ist gesteigert, was zu Änderungen wie erhöhte Immunglobulin-Mengen im Serum (IgE), Eosinophilie, verminderte Aktivität der natürlichen Killerzellen im peripheren Blut, eine Einschränkung der verzögerten Typ-IV-Antwort in der Haut und ein erhöhtes Risiko für sekundäre Malignitäten führt. Neben diesen Veränderungen ist das Resultat der Tumorzellproliferation ein verändertes Verhältnis von inflammatorischen T-Zellen zu T-Helferzellen ( $T_H1/T_H2$ ) zugunsten der T-Helferzellen, die durch eine mögliche Interferon- $\gamma$ -Resistenz der Tumorzellen unterstützt sein kann (Dummer et al., 2001). Das allmählich entstehende Ungleichgewicht der beiden  $CD4^+$  T-Zellen  $T_H1$  und  $T_H2$  könnte erklären, warum nicht maligne aktivierte  $CD4^+$  T-Zellen in der Haut allmählich verschwinden, die noch anfangs im Frühstadium des CTCL in ausreichenden Mengen beobachtet werden können (Bagot et al., 1998; Echchakir et al., 2000; Laetsch et al., 2000).

Andere Studien stellten fest, dass Interleukin-2 und Interleukin-7 proliferierend auf die Tumorzellen wirken und auch von ihnen selbst sezerniert werden (Foss et al., 1994a). Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen autokrinen, wachstumsstimulatorischen Mechanismus, der eine Rolle in der Tumorgenese spielt. Außer dieser proliferativen Wirkung regulieren Zytokine wie Interleukin-7 und Interleukin-15 auch die Expression der Transkriptionsfaktoren c-myc (Myeloblastosis Onkogen) und STAT5 (signal transducer of activator of transcription-5) hoch (Qin et al., 2001), die wiederum die Expression von Bcl-2



(B-cell lymphoma/leukemia-2) aktivieren. Bcl-2 wurde in frühen und späten Stadien der MF stark exprimiert gefunden (Dummer et al., 1995). Bcl-2 ist ein anti-apoptotischer Faktor und könnte dazu beitragen, dass die Tumorzellen nicht nur auf aktive Weise, nämlich durch Proliferation, sondern auch durch Blockierung von Apoptose länger am Leben bleiben und sich somit passiv ansammeln. Das immunsupprimierte Milieu, das vor allem durch die sezernierten Zytokine Interleukin-5 und Interleukin-10 und das resultierende Ungleichgewicht zwischen T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2 Zellen geschaffen wird, könnte ebenfalls dazu beitragen, dass sich die malignen Zellen anreichern.

Außer den bereits genannten genetischen Veränderungen beschäftigten sich weitere Studien mit möglichen Mutationen beim kutanen T-Zell Lymphom. Dabei konnten zusammengefasst Alterationen in der Expression der regulatorischen Proteine ras, c-myc, junD, tal-1, NFκB und CD95Ligand beobachtet werden (Kanavaros et al., 1994; Limon et al., 1995; van Doorn et al., 2002). Besonders der Transkriptionsfaktor STAT3 steht dabei im Fokus der CTCL-Forschung. Er wurde aufgrund einer permanenten Phosphorylierung konstitutiv aktiviert gefunden (Nielsen et al., 1999). STAT3 ist im Jak/Stat Signaltransduktionsweg über den Interleukin-2 Rezeptoren involviert und spielt daher eine wichtige Rolle in Wachstum und Aktivierung.

#### ***1.4.4. Hypothese „CTCL-Zellen sind regulatorische T-Zellen“***

Das mangelnde Wissen über die Pathogenese des Tumors könnte auch am Fehlen eines geeigneten *in vivo* Modells wie zum Beispiel eines Maus-Modells liegen. 2002 wurde ein *in vitro* Modell vorgestellt, in dem aus Patienten isolierte Tumorzellen bis zu 3 Monate in Kultur gehalten werden konnten, wenn sie gemeinsam mit unreifen dendritischen Zellen inkubiert wurden (Berger et al., 2002). Dieser Befund war für sie der Grund zur Annahme, dass die Tumorzellen nur proliferieren können, wenn sie im direkten Zell-Zell Kontakt zu Langerhans Zellen (unreife dendritische Zellen in der Haut) stehen. Ein weiteres Indiz für diese Hypothese war das Vorhandensein der bereits erwähnten Pautrier-Mikroabszesse in der Epidermis der Patienten, in denen Tumorzellen mit Langerhans Zellen zusammen lokalisiert vorliegen. Sie gelten, wie bereits erwähnt, vor allem histologisch als diagnostischer Marker für MF und SzS.

Zusätzlich führte die Diskussion über CTCL als eine durch chronische Antigen-Stimulierung induzierte Krebsform zur Annahme (Tan et al., 1974; Edelson, 1980), dass die antigenpräsentierenden Zellen der Haut, die Langerhans Zellen, entscheidend involviert sein müssen. In einer weiteren Studie wurde diese Hypothese erweitert: Nach der

Antigenpräsentation entwickeln CTCL-Zellen den Phänotyp von T-regulatorischen Zellen, die unter normalen Umständen in der Peripherie für immunologische Toleranz sorgen und immunsuppressiv wirken. Mit mehreren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nach Aktivierung der Tumorzellen eine zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Protein 4- (CTLA4) und auch eine FoxP3-Expression detektiert wurde, die wiederum beide für T-regulatorische Zellen spezifisch sind (Berger et al., 2005).

Der direkte Kontakt zwischen den unreifen Langerhans Zellen und den Tumorzellen zeichnet sich außerdem durch eine gegenseitige Abhängigkeit aus. Aus ihren Resultaten folgerten die Autoren, dass dendritische Zellen über das Antigenpräsentationsprotein MHCII (major histocompatibility complex II) Peptide von apoptotischen CTCL-Zellen auf ihrer Zelloberfläche tragen, was zur T-Zellrezeptor-Aktivierung und Proliferation der Tumorzellen führt. Es kommt zur Ausschüttung von Interleukin-10 und des Transformierenden-Wachstumsfaktors- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) der Tumorzellen. Beide Zytokine bewirken wiederum, dass die Langerhans Zellen nicht ausreifen bzw. aus dem Monozyten-Pool weitere neue unreife dendritische Zellen entstehen.

Die Hypothese, dass CTCL-Zellen dem T-regulatorischen Zelltyp angehören, wird durch verschiedene Tatsachen gestützt. Sie könnte die häufig beobachtete Immunsuppression (Axelrod et al., 1992) erklären, aufgrund derer CTCL-Patienten regelmäßig an opportunistischen Krankheiten sterben. Im fortgeschrittenen Stadium ist die Anzahl an normalen T-Zellen stark gesunken (Rook and Heald, 1995), was vielleicht am negativen Einfluss der T-regulatorischen Zellen auf die T-Zellentstehung liegen könnte. Eine Interleukin-10 und TGF- $\beta$ -Expression der CTCL-Zellen wurde bereits auch in anderen Studien gezeigt (Hoppe et al., 1990; Asadullah et al., 1996; Bagot et al., 2001a). Ihre Abhängigkeit von Langerhans Zellen könnte eventuell erklären, warum die Tumorzellen sich primär in der Epidermis manifestieren und nicht im Knochenmark.

## **1.5. Behandlung von kutanen T-Zell Lymphomen**

Heutzutage werden vor allem stadiengerechte und eher zurückhaltende Therapien empfohlen. Sie werden dabei in lokale und systemische Formen eingeteilt.

Bei CTCL im Frühstadium reichen lokale Therapien vor allem Lichttherapien mit UV-B-Licht und Licht-Chemotherapien wie die Psoralen-UV-A-Lichttherapie (PUVA) aus, um die lokal noch in der Haut restringierten Tumorzellen zu bekämpfen. PUVA besteht aus einer oralen Photosensibilisierung durch Gabe des DNA-Interkalators 8-Methoxypsoralen (8-MOP) und einer anschließenden Bestrahlung der Haut mit UV-A-Licht, das in die Epidermis

eindringen kann. Dabei kann eine komplette Remission nach 5 Monaten beobachtet werden. Die Langzeit-Heilungsrate ist allerdings noch unklar (Diederens et al., 2003).

Bei der Behandlung von CTCL im Tumorstadium ist eine Strahlentherapie mit schnellen Elektronen (Quiros et al., 1996) oder eine Kombination von PUVA mit Retinoiden und/oder Interferon- $\gamma$  oft effektiv. Aufgrund von hohen Rückfallquoten bei Behandlungen mit einzelnen lokal aufgetragenen Chemotherapeutika werden vermehrt Kombinationstherapien durchgeführt.

Bei weiter fortgeschrittenen Stadien, in denen die malignen Zellen ihren Bezug zur Hautumgebung verlieren und nun auch im peripheren Blut und in Lymphknoten zu finden sind, reichen lokale Therapien nicht mehr aus. Solche Patienten reagieren auf die extrakorporale Photopherese (ECP) (Heald et al., 1992). Dabei werden aus dem Gesamtblut der Patienten Lymphozyten-angereicherte Fraktionen isoliert, die mit 8-Methoxypsoralen behandelt, anschließend UV-A Bestrahlung ausgesetzt und schließlich dem Patienten wieder zugeführt werden. Studien mit einer Kombination von extrakorporaler Photopherese und Interferon- $\alpha$  zeigten auch gute Ergebnisse (Rook et al., 1991; Gottlieb et al., 1996).

Systemische Therapien für fortgeschrittene und refraktäre CTCL beinhalten den Einsatz von gängigen und auch neuen Zytostatikaformen (Foss et al., 1994b; Zinzani et al., 1998; Kurzrock et al., 1999; Dearden et al., 2000; Piekarczyk et al., 2001; Sallah et al., 2001; Sandor et al., 2002; Quagliano et al., 2004; Tsimberidou et al., 2004).

Generell ist jedoch die Behandlung von kutanen T-Zell Lymphomen bislang nur palliativer Natur. Die Patienten können durch Therapien von einigen Symptomen befreit, aber nicht geheilt werden. Aggressive Therapien zeigten zwar hohe komplette Remissionsraten, erwiesen sich aber als stark toxisch und ermöglichten meist kein Vorteil für das Gesamtüberleben (Hoppe et al., 1990).

### ***1.5.1. Immuntherapeutische Ansätze***

Da die meisten Therapieansätze bislang keine endgültige Heilung für CTCL-Patienten erzielten, wurde viel Energie in die Erforschung immuntherapeutischer Ansätze gesteckt. Eine Alternative zu den bislang eingesetzten Therapien könnten dabei Vakzinierungen mit tumorspezifischen Antigenen sein. Dendritische Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (APC) werden dabei mit tumorspezifischen Peptiden beladen und dem Patienten zugeführt (Berger et al., 2001; Reddy et al., 2001; Gatzert and Okada, 2002). Eine Quelle für ein solches Antigen stellt der jeweilige Idiotyp des T-Zellrezeptors der Tumorzelle selbst dar. Da jedoch

die Entwicklung eines solchen Epitops für jeden Patienten individuell durchgeführt werden müsste, ist die Finanzierung einer solchen Therapie für alle Patienten utopisch. Es ist daher notwendig Tumorantigene zu finden, die bei möglichst vielen Patienten von ihren Tumorzellen exprimiert werden. Zurzeit beschäftigen sich viele Gruppen mit der Suche nach solchen Proteinen des kutanen T-Zell Lymphoms. Kandidaten-Tumorantigene wie das Cancer-Testis Antigen cTAGE-5 (Cutaneous T-cell lymphoma associated gene-5), die neben Tumorgeweben nur in Testisgewebe exprimiert werden, wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits identifiziert (Eichmüller et al., 2001; Eichmüller, 2002; Eichmüller et al., 2003; Hartmann et al., 2004).

Neben Studien mit der Beladung von dendritischen Zellen werden auch Ansätze für Antikörpertherapien durchgeführt, die ihr Epitop in membranständigen Proteinen auf den Tumorzellen haben. Bevor solche für das kutane T-Zell Lymphom vorgestellt werden, sollen zunächst die Entwicklung und das Prinzip von therapeutischen Antikörpern und bereits zugelassene beschrieben werden.

## **1.6. Antikörpertherapien**

Bei Antikörpertherapien werden tumorspezifische Oberflächenproteine als Ziele für die Tumorbekämpfung verwendet. Im Unterschied zu anderen Immuntherapie-Ansätzen müssen die Kandidatenproteine selbst nicht stark immunogen sein.

### ***1.6.1. Entwicklung von monoklonalen Antikörpern***

Mit der Entwicklung der Hybridom-Technologie, die 1975 in *Nature* von Georges Köhler und César Milstein veröffentlicht wurde (Kohler and Milstein, 1975), war eine Massenproduktion von monoklonalen Antikörpern möglich geworden. Die Hybridom-Technologie basiert auf der somatischen Zellfusion einer Antikörper produzierenden B-Plasmazelle mit einer speziellen Myelomzelle, die selbst keine Immunglobuline herstellen kann. Da jedoch anfangs nur die Produktion von monoklonalen Maus-Antikörpern möglich war, brachte ihr Einsatz viele Nachteile und Nebeneffekte mit sich. Sie lösten humane Anti-Maus-Antikörper-Reaktionen in Patienten aus, die eine wiederholte Behandlung untersagten (Reichert, 2001). Zusätzlich waren sie mit einer sehr kurzen Halbwertszeit behaftet. So verfehlten trotz ihrer Spezifität viele Antikörper aufgrund ihres nicht humanen Ursprungs die erwünschte Wirkung.

Mit der Entwicklung von chimären (Boulianne et al., 1984) und auch humanisierten Antikörpern (Jones et al., 1986), bei denen die konstante Region humanen Ursprungs ist und die variable Region entweder voll murin (chimär) oder teilweise human (humanisiert) ist, konnte die Wirkung therapeutischer Antikörper verbessert werden (Buist et al., 1995; van Zaanen et al., 1998).

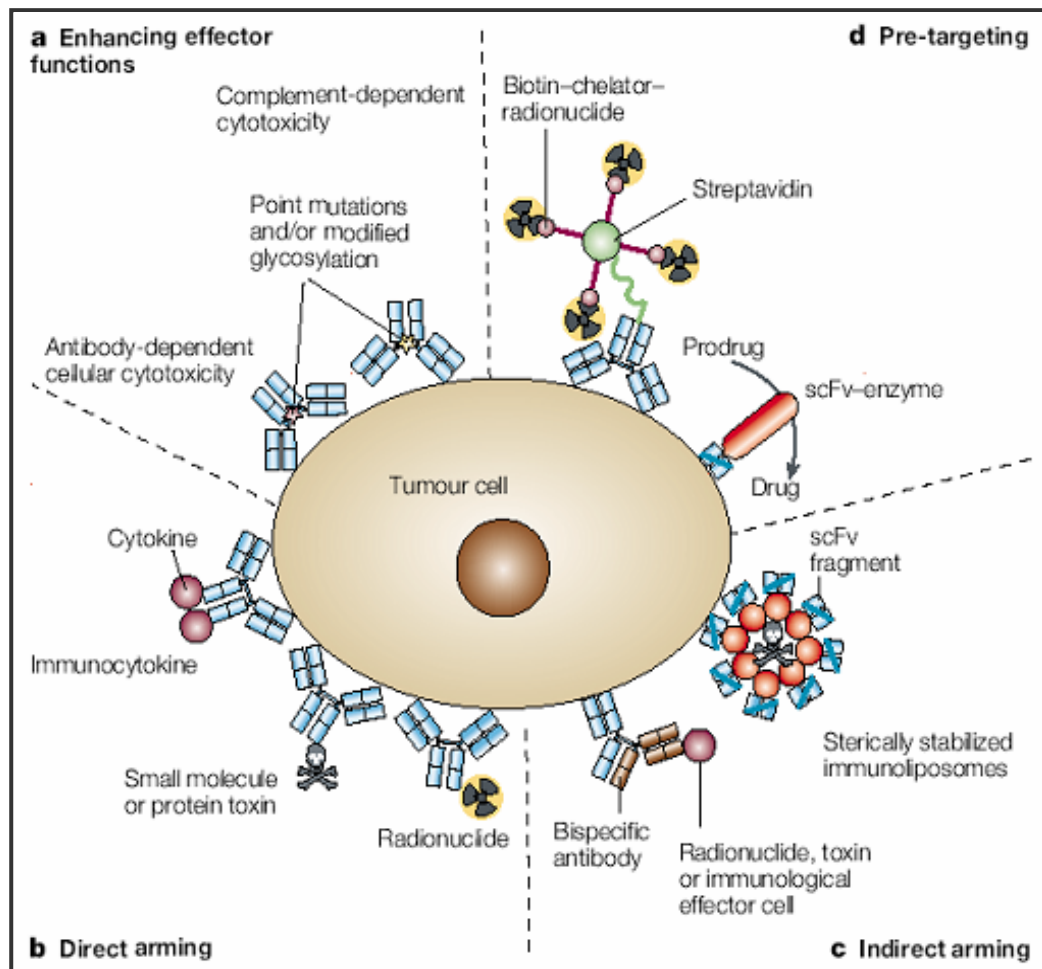
Erst mit der Gewinnung voll humaner monoklonaler Antikörper war es schließlich möglich geworden die meisten Anti-Antikörper Reaktionen zu umgehen. Zusätzlich entsprach die Halbwertszeit dieser Antikörper fast der von normalen IgG-Molekülen. Voll humane Antikörper werden mittels einer Phagen-Display Bibliothek oder transgenen Mäusen erzeugt (s. Übersichtsartikel von Burton and Barbas, 1993; Hoogenboom et al., 1993).

### ***1.6.2. Prinzip der Wirkweisen der Antikörper***

Zu den Hindernissen für eine wirksame Antikörperbehandlung, die nicht allein durch die Humanisierung der Antikörper bewältigt werden können, zählen i) die Heterogenität des Tumors d.h. nicht alle Tumorzellen tragen das Zielantigen, ii) eine ungleichmäßige Blutzufuhr zum Tumorgewebe, iii) ein hoher interstitieller Druck innerhalb des Tumors, iv) mögliche lösliche Formen der Antigene, die therapeutische Antikörper abfangen und v) eine mögliche Kreuzreaktivität mit Antigenen auf normalen Zellen.

Einige dieser Probleme können durch Modifizierungen der Antikörper gelöst werden (s. Abbildung 1). Antikörper werden gekoppelt mit Radionukliden eingesetzt um die Heterogenität der Tumorzellen zu umgehen. Sie töten mit ihrer radioaktiven Toxizität auch andere umliegende Tumorzellen ab („bystander effect“), die das Antigen nicht exprimieren. Dieses Vorgehen kann vor allem bei soliden Tumoren gewählt werden, da bei lymphoiden Malignitäten ein solcher Einsatz verheerende Auswirkungen im Immunsystem haben könnte. Für Tumore lymphoider Art wiederum eignen sich Antikörper, die mit bakteriellen, pflanzlichen oder Pilz-Toxinen gekoppelt sind. Solche Antikörper werden internalisiert und wirken erst im Zellinneren. Im Zytoplasma werden die Toxine durch endogene Enzyme aktiviert und töten die Zelle von innen ab.

Beide Varianten, die Radionuklid- und die Toxin-gekoppelten Antikörper, haben einen direkten Effekt um Tumorzellen zu eliminieren. Sie unterscheiden sich von „nackten“ Antikörpern, die mit indirekter Wirkung durch Induktion von Apoptose oder Blockierung des Zellwachstums die Tumorzellen abtöten.



**Abbildung 1: Zusammenfassung der Strategien aller therapeutischer Antikörper.**

In a sind die nackten Antikörper mit den indirekten Wirkweisen ADCC und CDC dargestellt, die hier als Effektor-verstärkend beschrieben sind. Teil b fasst die gekoppelten Antikörper mit direkten Wirkweisen über Toxine, Zytokine und Radionuklide zusammen. Unter c sind die bispezifischen und die stark modifizierten, die z.B. nur aus den Fv-Fragmente bestehen, beschrieben. Die letzte Gruppe bilden in d die Antikörper, die in Kombination mit einem Wirkstoff eingesetzt werden oder erst aktiviert werden müssen.

„Nackte“, ungekoppelte erreichen das Abtöten der Tumorzellen durch die Aktivierung von Effektor-Zellen des körpereigenen Immunsystems wie CD8<sup>+</sup> T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Makrophagen. Diese binden mit ihrem jeweiligen Fc-Rezeptor an die auf der Oberfläche der Tumorzellen befindlichen therapeutischen Antikörper. Es handelt sich hierbei um den Weg der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC; antibody dependent cellular cytotoxicity). Andererseits können monoklonale Antikörper durch Bindung an C1 das Komplementsystem aktivieren, was als Komplement-abhängige Zytotoxizität (CDC) bekannt ist.

Abschließend soll noch die Gruppe der bispezifischen Antikörper erwähnt werden. Diese Antikörper tragen zwei Spezifitäten, d. h. ein Arm des Antikörpers ist gegen ein Antigen auf Tumorzellen und der andere Arm ist gegen ein Antigen auf Effektorzellen wie T-Zellen, Phagozyten und Antigen-präsentierenden Zellen gerichtet. Diese Antikörper bringen so

Tumorzellen mit Effektorzellen in unmittelbare Nähe und erzielen damit ein effizientes und eventuell beschleunigtes Abtöten der Tumorzelle ohne das Komplementsystem mit einzubeziehen, das gelegentlich für Nebeneffekte verantwortlich sein kann.

Kommerziell gesehen bilden monoklonale Antikörper eine große Gruppe der biopharmazeutischen Agentien bei der Bekämpfung von Tumoren und auch Entzündungskrankheiten, Infektionen und Abstoßung von Transplantaten (Walsh, 2003). Für einen weit verbreiteten Einsatz in Therapien müssen sie zunächst in Phase III Studien auf ihre Wirkung analysiert und schließlich von regulatorischen Institutionen wie EMEA (European Agency for the Evaluation of Medical Products) oder FDA (Food and Drug Administration) genehmigt werden.

### ***1.6.3. Zugelassene monoklonale Antikörper im Einsatz gegen Tumore***

Ein monoklonaler Antikörper gegen CD20 mit dem Namen Rituximab ist seit 1997 von der FDA genehmigt und wird in der Behandlung von verschiedenen B-Zell Non-Hodgkin Lymphomen verwendet. Neben der Zytostatikagruppe der Taxane (Paclitaxel, Docetaxel,...) zählt Rituximab als das kommerziell erfolgreichste Krebsmedikament. Es ist ein unkonjugierter und chimärer Antikörper. CD20 selbst ist ein 30-40 kDa großes, phosphoryliertes Transmembran-Protein, das auf Zellen im Prä-B Zell- bis zum Lymphoblastenstadium exprimiert wird. Es ist nicht auf frühen Vorläufern wie Pro B-Zellen oder den später reifen B-Zellen, den Plasmazellen, zu finden. Allerdings liegt es auf 95% aller B-Zell Non-Hodgkin Lymphome (NHL) auf der Oberfläche exprimiert vor. Rituximab-Bindung an Tumorzellen führt zu Apoptose und Antikörper- oder Komplement-abhängiger zellulärer Zytotoxizität (Press et al., 1987; Maloney et al., 1997a; Maloney et al., 1997b; McLaughlin et al., 1998).

Durch die Identifizierung von stark überexprimierten Tumorantigenen konnten auch für solide Tumore therapeutische Antikörper entwickelt werden. Mit der Identifizierung von HER2/neu wurde ein geeignetes Zielprotein für die Bekämpfung von Brustkrebs gefunden (Slamon et al., 1987). Ein humanisierter Antikörper wurde hergestellt und in einer Studie mit 470 Brustkrebspatientinnen mit Metastasen in Kombination mit Chemotherapie untersucht (Slamon et al., 2001). Trotz starker Nebenwirkungen konnte das allgemeine klinische Befinden der Patienten verbessert werden, so dass die Zulassung eines gegen HER2/neu gerichteten Antikörpers namens Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) durch die FDA 1998 stattfand. Seine Wirkung erzielt Trastuzumab durch die Blockierung der Signaltransduktionskaskade,

die durch den Wachstumsfaktor-Rezeptor induziert wird. Diese Inhibition mündet schließlich in Apoptose (Carter et al., 1992).

Weitere bereits in der Anwendung stehende und noch in Studien befindliche Antikörper sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Zurzeit angewendete und noch in Studien befindliche Antikörper (Harris, 2004)**

Ziel-Antigen	Krebsart	Antikörper	Antikörper-Typ	Studien-Status
CD20	Non-Hodgkin Lymphoma	Rituximab	chimär	Genehmigt von der FDA <sup>1</sup> 1997
		90Y-Ibritumomab tiuxetan	Murin radiogekoppelt	Genehmigt von der FDA 2002
		131-Tositumomab	Murin radiogekoppelt	Genehmigt von der FDA 2003
CD22	Non-Hodgkin Lymphoma	Epratuzumab	humanisiert	Phase I-II
		90-Y-Ebratuzumab	Humanisiert radiogekoppelt	Phase I
HLA-DR	Non-Hodgkin Lymphoma	Remitogen	humanisiert	Phase II
HER2/NEU	Brustkrebs	Trastuzumab	humanisiert	Genehmigt von der FDA 1998
CD33	Akute myeloische Leukämie	Gemtuzumab ozogamicin	humanisiert	Genehmigt von der FDA 2000
CD52	B-Zell chron. lymphat. Leuk.	Alemtuzumab	humanisiert	Genehmigt von der FDA 2001
Carcinoembryon. Antigen	Epithelialer Krebs	90-CEA-cide	Humanisiert radiogekoppelt	Phase I/II
Epidermal. Wachstumsfaktor Rezeptor	Kolorektal (adjuvante Ther.)	Edrecolomab	Murin	Genehmigt in Deutschland 1995
EGFR <sup>2</sup>	Kolorektal, Kopf/Hals, NSCLC	Cetuximab	chimär	Phase I/II/III, genehm. von der FDA 2004 für metast. Kolorektalkrebs
		h-R3	humanisiert	Phase I/II
		ABX-EGF	Human (transg. Maus)	Phase I/II
Vaskulär. Endothelial. Wachstumsfaktor	Solide Tumore	Bevacizumab	humanisiert	Phase II/III, genehm. von der FDA 2004 metast. Kolorektalkrebs
VEGFR2 <sup>3</sup>	Solide Tumore	IMC-1C11	chimär	Phase II/III
A33	Kolorektal	huA33	humanisiert	Phase I/II
G250/MN	Renal-Zell Karzinoma	G250	chimär	Phase I/II
Lewis Y Antigen	Epithelialer Krebs	SGN-15	chimär	Phase I/II
		Hu3S193	humanisiert	Phase I
GD3	Melanom	KW-2871	chimär	Phase I

<sup>1</sup> FDA, US Food and Drug Administration;

<sup>2</sup> EGFR, epidermal growth-factor receptor;

<sup>3</sup> VEGFR2, vascular-endothelial growth-factor receptor



## 1.7. Antikörpertherapie-Ansätze bei CTCL

Therapeutische Antikörper sind bislang noch nicht für die Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms zugelassen. Einige Kandidaten werden in Studien auf ihren Heilungs- und Nebeneffekte untersucht. Zu ihnen gehört ein monoklonaler humanisierter Antikörper gegen CD52 (Alemtuzumab), der bereits für die Behandlung von B-Zell chronischen lymphatischen Leukämien verwendet wird. In Phase II Studien wurde er zur Behandlung von MF und SzS Patienten im fortgeschrittenen Stadium eingesetzt (Knox et al., 1991; Kennedy et al., 2003; Lundin et al., 2003). Dabei zeigten SzS-Patienten eine höhere Antwortrate. Es wurde allerdings auch eine signifikante hämatologische und immunsuppressive Toxizität beobachtet. Patienten, die vorher bereits stark therapiert worden waren, litten zusätzlich an ernsthaften Infektionen. Außerdem zeigten einige Patienten schwere Herzfunktionsstörungen in Form von Arrhythmie und Herzversagen.

Bereits 1991 untersuchte eine Phase I Studie die Wirkung von Anti-CD4 Antikörpern bei Patienten mit MF oder SzS. Dabei zeigten 7 von 8 Patienten ein Tumorprogressionsstopp. Im Unterschied zu Anti-CD52 wurde die Behandlung gut toleriert und Anzeichen für Immunsuppressivität konnten nicht beobachtet werden (Knox et al., 1991).

Im Juni 2005 stellte M. Duvic auf der neunten internationalen Konferenz über maligne Lymphome eine Phase II Studie vor, in der Patienten mit refraktärem MF oder SzS mit einem voll humanen CD4 Antikörper (HuMax-CD4) therapiert worden waren. Die Behandlung zeigte gute, dosisabhängige und langanhaltende Antwortraten. Auch gab es hier keine schwergradigen Nebeneffekte (Duvic, 2005).

## 1.8. Tumorspezifische Plasmamembranproteine bei CTCL

Wie bereits angeführt sind für die Etablierung von Antikörpertherapien Proteine, die auf der Zelloberfläche sitzen und deren Expression tumorspezifisch ist, eine Grundvoraussetzung. Zudem können sie nicht nur in der Therapie sondern auch in der Diagnose und in der Aufklärung der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielen. Der Begriff Tumorspezifität sollte dabei nicht nur so verstanden werden, dass Proteine ausschließlich auf Tumorzellen zu finden sind, vielmehr sind es eine Überexpression oder eine spezifische Veränderung eines Oberflächenproteins auf Tumorzellen. Ein Beispiel für ein in Tumorzellen überexprimiertes Plasmamembranprotein ist das bereits erwähnte HER2/neu. Der Tyrosinkinase-Rezeptor gehört zur Familie der erbB-ähnlichen Onkogene und ist eng verwandt mit dem EGF-Rezeptor (epidermal growth factor). Es wurde zunächst in Brustkrebs-Zelllinien und später

auch in 25-30% von Brustkrebspatientenproben überexprimiert gefunden. Es konnte dabei eine Korrelation zwischen Überexpression von HER2/neu und einer gesteigerten aggressiven Form der Krankheit mit signifikant verkürztem krankheitsfreiem und Gesamt-Überleben beobachtet werden. Diese Beobachtungen sprachen daher dem Protein eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Brustkrebses zu (Slamon et al., 1987).

Wie für andere Tumorarten sind auch für das kutane T-Zell Lymphom solche tumorspezifischen Plasmamembranproteine gesucht worden. Bagot et al. stellten zum ersten Mal 2001 in einer Studie p140/KIR3DL2 als ein für CTCL-Zellen spezifisches Oberflächenprotein vor (Bagot et al., 2001b). Man findet dieses Mitglied der Killer Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) zwar auch auf einer Untergruppe der natürlichen Killerzellen und einer geringen Anzahl an peripheren CD8+-Zellen, jedoch zeigten Sequenzanalysen, dass es sich bei den auf CTCL-Zellen um eine neue allelische Form von p140/KIR3DL2 handelt, die sich in vier Aminosäure-Substitutionen ausdrückt. Killer Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) fungieren als Inhibitoren der Natürlichen Killerzell-vermittelten Zytotoxizität, indem sie mit verschiedenen Allelen des humanen Leukozyten Antigens des Typs I (HLA I) interagieren. 2003 zeigte eine weitere Studie, dass dieser Rezeptor als histologischer Marker zur Unterscheidung des gleich aussehenden Hautbildes von Mycosis fungoides und Sézary Syndrom dienen könnte (Wechsler et al., 2003). Sie konnten *in situ* zeigen, dass p140/KIR3DL2 im Gegensatz zu MF in allen von ihnen untersuchten SzS-Patientenschnitten detektiert wurde.

Ein weiteres CTCL-spezifisches Oberflächenprotein wurde 2001 vorgestellt (Nikolova et al., 2001). Es handelt sich um den Rezeptor SC5, der auf einer kleinen Untergruppe von CD4+ und CD8+ T-Zellen und B- und NK-Zelllinien exprimiert wird. In zirkulierenden T-Zellen wurde SC5 zunächst intrazellulär gefunden, das jedoch nach *in vitro* Aktivierung auf der Oberfläche detektiert werden konnte. Der Vergleich der T-Zellen von SzS Patienten mit denen von gesunden Probanden zeigte, dass die Anzahl an SC5+ CD4+ T-Zellen in SzS Patienten erhöht ist und diese mit der Sézary Zellanzahl korreliert. Zusätzlich konnten sie zeigen, dass eine Proliferation, die durch Zugabe eines Anti-CD3-Antikörpers induziert wurde, durch Bindung des Antikörpers an den SC5 Rezeptor inhibiert wurde. Mit diesem Rezeptor scheinen sie einen Faktor gefunden zu haben, der im kutanen T-Zell Lymphom für eine Regelung der Proliferation sorgt, was noch weiter zu untersuchen gilt.

In einer Studie mit Oligonukleotid-Array Analysen wurde die Genexpression von CD4+ T-Zellen aus peripherem Blut von Sézary Syndrom Patienten mit der von T-Zellen von

Kontrollgruppen verglichen (van Doorn et al., 2004). Dabei zeigte das Plasmamembranprotein EphrinA4 eine erhöhte Transkriptmenge im Sézary Syndrom im Vergleich zu den übrigen Gruppen. EphrinA4 ist ein Tyrosinkinase-Rezeptor und bislang mit anderen Mitgliedern der Eph-Rezeptorfamilie vorwiegend in der Regulation der neuronalen Migration und Angiogenese involviert gefunden worden. Interessant ist, dass stromabwärts von ihm stehende Komponenten wie Fyn, Grb2 und Abl im Sézary Syndrom überexprimiert gefunden worden waren. Auch der im Fokus der CTCL-Forschung stehende Transkriptionsfaktor STAT3 könnte als Folge von EphrinA4-Bindung aktiviert sein. Anders als die beiden zuvor genannten Proteine scheint EphrinA4 nicht inhibitorisch, sondern positiv die Aktivierung der Tumorzellen zu regulieren.

Gegenüber CD52 und CD4, die bereits als Ziele in Antikörper-Studien in der Behandlung von CTCL benutzt werden, haben diese drei Plasmamembranproteine den Vorteil, dass ihre Expression tumorspezifisch für das CTCL ist. Gegen sie gerichtete Antikörper könnten eventuell die erwähnten Nebenwirkungen der eingesetzten Anti-CD52 Antikörper auslassen. Nackte therapeutische Antikörpern gegen p140/KIR3DL2 und SC5 könnten allerdings aufgrund ihres ohnehin inhibitorischen Charakters ohne Wirkung sein. In diesen Fällen müssten die Antikörper mit Radionukliden oder mit Toxinen gekoppelt eingesetzt werden, die wiederum Gefahren bergen. Ein therapeutischer Antikörper gegen EphrinA4 könnte das Wachstum von Tumorzellen stoppen. Allerdings könnte es aufgrund seiner Expression im Gehirn Nebenwirkungen mit sich führen.

Zusammengefasst ist die Liste der bereits gefundenen Kandidatenproteine nicht lang. Dies erklärt nun auch die Notwendigkeit der weiteren Suche nach tumorspezifischen Oberflächenproteinen. Auch die bislang noch unbekannten Schritte der Entstehung des kutanen T-Zell Lymphoms könnten mit der Identifizierung von weiteren Plasmamembranproteinen teilweise aufgeklärt werden. Es ist daher von großem Interesse die gesamte Oberfläche der Tumorzellen mit allen möglichen Proteinen zu erfassen, wie sie in dieser Arbeit erreicht werden soll.

## **1.9. Ziel der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollen für das kutane T-Zell Lymphom spezifische Oberflächenproteine identifiziert werden, die möglicherweise als Zielstrukturen für therapeutische Antikörper dienen oder auch in der Aufklärung der Tumorentstehung hilfreich

sein könnten. Dafür soll zunächst mit Hilfe von differentiellen Zentrifugationsschritten ein natives Oberflächenpräparat der CTCL-Zelllinie HuT78 hergestellt werden, mit dem Kaninchen immunisiert werden um reaktive Antiseren zu generieren. Die gewonnenen Antiseren sollen zunächst auf ihre Seroreaktivität und Spezifität mit der ELISA-, Western Blot- und auch immunzytochemischen Methode kontrolliert werden um sie schließlich in zwei Analysen einsetzen zu können. Als erstes wird eine Immunpräzipitation durchgeführt, bei der präzipitierte Proteine aus Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen ausgeschnitten und mit den massenspektrometrischen Methoden MALDI-TOF und ESI-MS/MS identifiziert werden sollen. Als zweites sollen die Kaninchenserum in einer serologischen Analyse einer cDNA-Phagenbank der CTCL-Zelllinie SeAx mit der SEREX-Methode (serological identification of antigens by recombinant expression cloning) ihre Verwendung finden. Insetierte cDNA Stücke aus reaktiven Phagenklonen werden sequenziert um sie in Datenbanken mit Computeranalysen des HUSAR-Programms identifizieren zu können. Aus den gefundenen Kandidatengen sollen schließlich aufgrund ihrer Lokalisation und Funktion interessante ausgewählt werden und mit Hilfe von Real-time PCR und Western Blot Analysen auf ihre Expression im kutanen T-Zell Lymphom untersucht werden.

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### Chemikalien

Aceton	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Agar	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>
Agarose	<i>Biozym Scientific GmbH, Hes. Oldendorf</i>
Bovines Serumalbumin (BSA)	<i>Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg</i>
5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP)	<i>Biomol GmbH, Hamburg</i>
Casein	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Coomassie Brilliant Blue G250 (CBB-G250)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Coomassie Brilliant Blue R (CBB-R)	<i>Gerbu Biochemicals GmbH, Gaiberg</i>
Dimethylformamid (DMF)	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Dimethylpimelinediimidate (DMP)	<i>Fluka Biochemika GmbH, Buchs</i>
Dimethylpyrocarbonat (DMPC)	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Dimethylsulfoxid (DMSO)	<i>Merck, VWR International, Darmstadt</i>
Ethyleneglycol-bis(beta-aminoethyl)-N,N,N,N-tetraacetoxymethyl-Ester (EGTA)	<i>AppliChem GmbH, Darmstadt</i>
Essigsäure (100%)	<i>J.T. Baker, Deventer, NL</i>
Ethanolamin	<i>Fluka Biochemika GmbH, Buchs</i>
Ethidiumbromid	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Ethanol, absolut	<i>Riedel-de-Haen GmbH, Seelze</i>
Formaldehyd (37%)	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Formamid	<i>Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe</i>
Gelatine	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Glycerin	<i>J.T. Baker, Deventer, NL</i>
Glycin	<i>Gerbu Biochemicals GmbH, Gaiberg</i>
Hefe Extrakt	<i>Gerbu Biochemicals GmbH, Gaiberg</i>
Isopropanol	<i>Riedel-de-Haen GmbH, Seelze</i>
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Kaliumchlorid	<i>Merck, VWR International, Darmstadt</i>
Kaliumdihydrogenphosphat	<i>Merck, VWR International, Darmstadt</i>
Maltose	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim</i>
Magnesiumsulfat	<i>Fluka Biochemika GmbH, Buchs</i>

---

Magermilchpulver	<i>Fluka Biochemika e GmbH</i> , Buchs
Maltose	<i>Merck, VWR International</i> , Darmstadt
$\beta$ -Mercaptoethanol	<i>Merck, VWR International</i> , Darmstadt
Methanol	<i>Fluka Biochemika GmbH</i> , Buchs
3-(N-Morpholino) propansulfonsäure (MOPS)	<i>Gerbü Biochemicals GmbH</i> , Gaiberg
Natriumazetat	<i>Fluka Biochemika GmbH</i> , Buchs
Natriumacid	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
Natrium-tetraborat-decahydrat	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
Natriumchlorid	<i>Carl Roth GmbH +Co. KG</i> , Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	<i>Merck, VWR International</i> , Darmstadt
Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure	<i>Acros Organics</i> , NJ, USA
Natriumhydrocarbonat	<i>AppliChem GmbH</i> , Darmstadt
Natriumcarbonat	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
Natronlauge	<i>Merck, VWR International</i> , Darmstadt
Nitrobluetetrazolium (NBT)	<i>Biomol GmbH</i> , Hamburg
NZ Amine-A	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	<i>Biochrom KG</i> , Berlin
Ponceau S	<i>AppliChem GmbH</i> , Darmstadt
Saccharose	<i>J.T. Baker</i> , Deventer, NL
Schwefelsäure	<i>NeoLab Migge GmbH</i> , Heidelberg
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	<i>Gerbü Biochemicals GmbH</i> , Gaiberg
Tetramethylbenzidine (TMB)	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
Trizma Base	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
TritonX-100	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
Trypton	<i>Difco Voigt Global Distrib. LLC</i> , USA
Tween-20	<i>Sigma Aldrich Chemie GmbH</i> , Steinheim
Wasserstoffperoxid	<i>J.T. Baker</i> , Deventer, NL

## 2.1. Zellkultur

### Material

#### **Geräte:**

*Sterilgard Hood*, Sterilbänke  
Brutschränke

*The Baker Company Inc.*, Sanford, USA

*Kendro Laboratory Products GmbH*,  
Langenselbold

*Peltier Thermal cycler* (PTC 200)

*Biozym Diagnostik GmbH*, Hess. Oldendorf

#### **Verbrauchsmaterial:**

*Cellstar* Zellkulturflaschen

*Greiner Bio-One GmbH*, Frickenhausen

*Costar* 10ml-Pipetten

*Corning Inc.*, Corning, USA

*Rotrand* Filter, 0,2µg, Celluloseacetat

*Schleicher & Schüll GmbH*, Dassel

50ml-Spritzen

*Terumo Europe N.V.*, Leuven, Belgien

50mL-Falconröhrchen

diverse Firmen

#### **Diverse Materialien:**

1xPBS (steril)

*Biochrom AG*, Berlin

flüssiger Stickstoff

*Messer*, Griesheim

#### **Medium:**

RPMI

*Biochrom AG*, Berlin

Penicillin/Streptomycin

*Biochrom AG*, Berlin

L-Glutamin

*Biochrom AG*, Berlin

*Seraplus*, FCS (fötales Kalberserum)

*Pan Biotecs GmbH*, Aidenbach

#### **Antibiotika:**

BM-Cyclin<sup>®</sup>

*Roche Diagnostics GmbH*, Mannheim

Ciprobay<sup>®</sup>

*Bayer Healthcare*, Leverkusen

Plasmocin<sup>®</sup>

*InvivoGen*, San Diego, USA

### **Suspensions-Zelllinien:**

#### **HuT78 (TIB-161)**

*ATCC*, Manassas, VA, USA

CD4+ CTCL-Zelllinie, die aus peripherem Blut eines 53 Jahre alten männlichen Patienten mit Sézary Syndrom etabliert worden ist (Gootenberg et al., 1981).

#### **SeAx**

freundlicherweise erhalten von K. Kaltoft  
(Aarhus, Dänemark)

CD4+ CTCL-Zelllinie, die aus peripherem Blut einer 66 Jahre alten weiblichen Patientin mit Sézary Syndrom etabliert worden ist (Kaltoft et al., 1987).

#### **HH (CRL-2105)**

*ATCC*, Manassas, VA, USA

CD4+ CTCL-Zelllinie, die aus peripherem Blut eines 61 Jahre alten männlichen Patienten mit aggressivem kutanen T-cell Lymphom/Leukämie etabliert worden ist (Starkebaum et al., 1991).

**Cou-L3**

freundlicherweise erhalten von A.Bensussan  
(Créteil, Frankreich)

CD8+ CTCL-Zelllinie, die aus peripherem Blut eines 81 Jahre alten männlichen Patienten mit Mycosis fungoides und späterem pleomorphem großzelligem T-Zell Lymphom etabliert worden ist (Echchakir et al., 2000).

**MyLa**

freundlicherweise erhalten von K. Kaltoft  
(Aarhus, Dänemark)

CD4+ CTCL-Zelllinie, die aus einer Hautprobe eines 82 Jahre alten männlichen Patienten mit Mycosis fungoides etabliert worden ist (Kaltoft et al., 1992).

**Methode**

Erreichen die Zellen eine Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml, werden sie halbiert und teilweise geerntet, d.h. sie werden mit 1x PBS gewaschen, anschließend pelletiert und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zu ihrer Weiterverwendung können die Zellpellets bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden. Die andere Hälfte wird ebenfalls mit 1x PBS gewaschen und in frischen RPMI-Medium aufgenommen, das 1% Penicillin/Streptomycin, 2% L-Glutamin und 10% FCS enthält. Ihre Kultivierung findet bei 5 %  $\text{CO}_2$  und  $37^\circ\text{C}$  statt. SeAx Zellen werden zusätzlich mit 1000 U/ml und Cou-L3 mit 150 U/ml Interleukin-2 kultiviert.

Um auf eine mögliche Mycoplasmen-Kontamination zu testen, sollte eine PCR mit Mycoplasmen-spezifischen Primern durchgeführt werden. Nachdem die Zellen abzentrifugiert sind, wird etwas vom alten Medium abgefüllt, für 5min bei  $95^\circ\text{C}$  inkubiert, 1min bei 13.000rpm abzentrifugiert und der Überstand für eine PCR verwendet.

Ansatz (Reagenzien siehe Klassische PCR)

Probe	1µl	
PCR Puffer	2,5µl	(1x)
DMSO	2,5µl	(10x)
Primer Myko for	1µl	(1µM) (ggg agc aaa cag gat tag ata ccc t)
Primer Myko rev	1µl	(1µM) (tcg acc atc tgt cac tct gtt aac ctc)
Taq Polymerase	0,5µl	(2,5U)
dNTP-Mix	0,5µl	(0,8µM)
Braun- $\text{H}_2\text{O}$	ad 25µl	
Annealingtemperatur : $60^\circ\text{C}$ , 30 Zyklen		

Ist bei ca. 250 kb eine Bande zu sehen, sollten die mit Mycoplasmen infizierten Zellen sofort von den nicht-infizierten Zellen getrennt gehalten werden. Die Behandlung der Zellen kann mit verschiedenen Antibiotika erfolgen, die die Replikation oder die Proteinsynthese unterbrechen. Eine Kombination von zwei Antibiotika mit unterschiedlicher Wirkung ist meist sehr effektiv.



BM-Cyclin 1 ist ein Pleuromutilin-Derivat und BM-Cyclin 2 ein Tetracyclin-Derivat. Beide hemmen Schritte in der Proteinsynthese. Wohingegen Ciprobay® (Ciprofloxacin) einen wichtigen Schritt in der Replikation inhibiert. Es ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der Fluorochinolone. Kurzzeitig wurde auch Plasmocin zur Behandlung der Zellen verwendet. Es enthält Substanzen, die einerseits die DNA- und andererseits die Proteinsynthese hemmen. Allerdings erwies sich die Behandlung mit Plasmocin® nicht so wirksam wie mit BM-Cyclin® und Ciprobay®.

Nach folgendem Schema wurden die Zellen behandelt:

3 Tage: BM-Cyclin 1 mit Endkonz. von 10µg/ml + Ciprobay mit Endkonz. von 10µg/ml

4 Tage: BM-Cyclin 2 mit Endkonz. von 5µg/ml + Ciprobay mit Endkonz. Von 10µg/ml

Dieser Zyklus wird zweimal wiederholt. Während dieser Zeit sollten die üblich eingesetzten Antibiotika Pencillin und Streptomycin ausgelassen werden. In jedem Fall sollte ein zusätzlicher Behandlungszyklus durchgeführt werden, nachdem die Eliminierung der Mycoplasmen festgestellt wurde.

## 2.2. Plasmamembran-Anreicherung

### Material

#### **Geräte:**

Dewar-Stickstoffbehälter	<i>KGW Isotherm, Karlsruhe</i>
Schwingmühle MM301	<i>Retsch, Haan</i>
Mahlbecher aus Teflon	<i>Retsch, Haan oder institutseigene Werkstatt</i>
Mahlkugeln aus Wolfram später aus Stahl	<i>Retsch, Haan bzw. Neolab, Heidelberg</i>
Dounce Homogenisator	<i>Wheaton Science products, Millville, NJ, USA</i>
Stehzentrifuge	<i>Kendro Lab. Prod. GmbH, Langenselbold</i>
Ultrazentrifuge L5-50B	<i>Beckman, Fullerton, CA, USA</i>
70.1Ti-Rotor	<i>Beckman, Fullerton, CA, USA</i>
SW28.1 Rotor	<i>Beckman, Fullerton, CA, USA</i>

#### **Verbrauchsmaterial:**

dazugehörige Ultrazentrifugenröhrchen	<i>Beckman, Fullerton, CA, USA</i>
Pasteurpipetten	<i>WU Mainz, Mainz</i>
15ml-, 50ml-Falconröhrchen	<i>diverse Firmen</i>

#### **Puffer und Substanzen:**

Protease-Inhibitor *Complete Mini*, EDTA-frei      *Roche Diagnostics, Penzberg*

Puffer A:

250mM      Sucrose  
12mM      Tris-HCl, pH 7,4

und bei einem Volumen von 50ml 1 Proteinase-Inhibitortablette (*Complete Mini*, EDTA-frei)

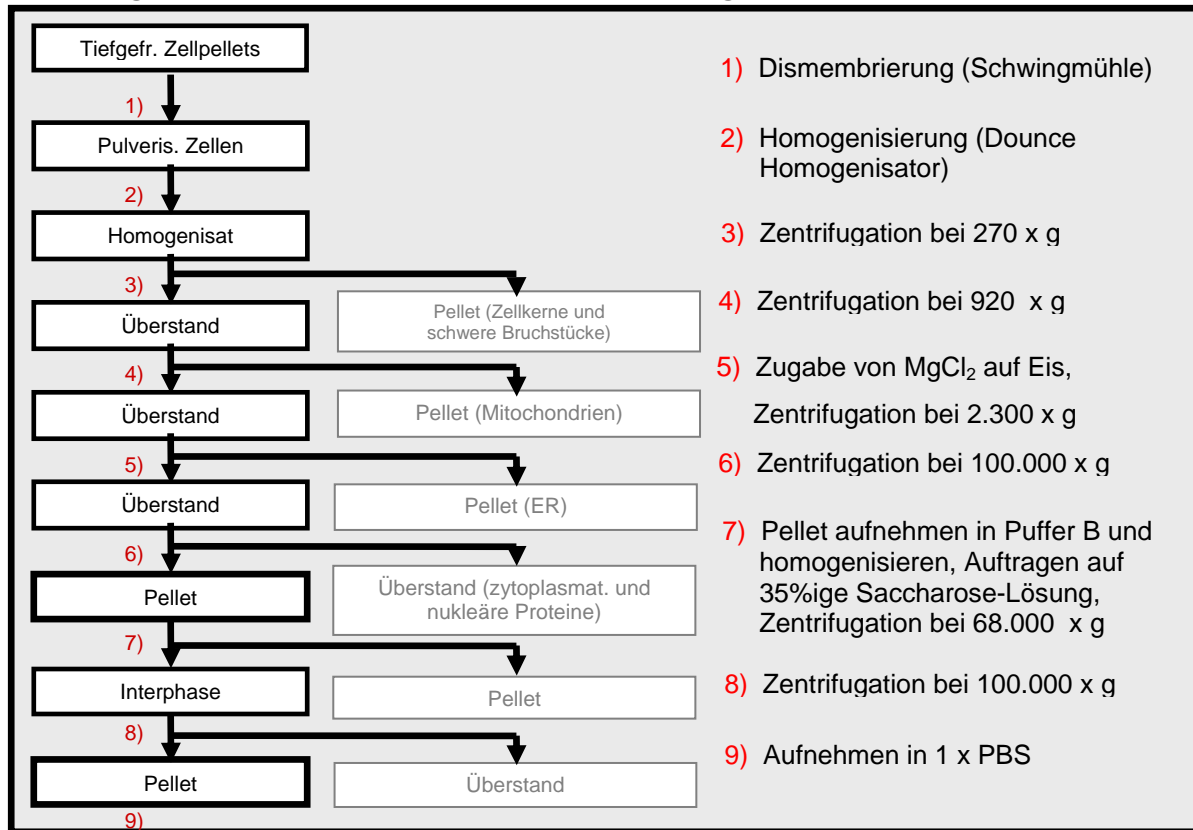
Puffer B:  
250mM Saccharose  
5mM Na<sub>2</sub>EDTA  
12mM Tris-HCl, pH 7,4

30% Saccharose-Lösung in 10mM Tris-HCl, pH 7,4  
1 x PBS  
MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O

## Methode

Die Anreicherung wurde nach einer modifizierten Methode nach Ellis et al. durchgeführt (Ellis et al., 1992) und ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

Die bei -80°C gelagerten Zellpellets werden in flüssigem Stickstoff auf -196°C heruntergekühlt, in einen ebenfalls vorgekühlten Teflonbehälter mit einer Wolfram- oder Stahlkugel gegeben und für 1min bei 3000rpm in einer Schwingmühle pulverisiert. Anschließend werden die Zellfragmente in einen mit 5ml Puffer A vorgelegten Dounce-Homogenisator überführt. Nach 12 vorsichtigen Hieben entsteht eine gut durchmischte Suspension, der weitere 5ml Puffer A hinzugegeben werden. In einem 15ml-Falconröhrchen wird das Homogenisat für 10min bei 270 x g (1600rpm) zentrifugiert, danach der Überstand in ein neues 15ml-Falconröhrchen überführt und für weitere 10min bei 920 x g (2300rpm) zentrifugiert. Erneut wird der Überstand abgenommen und mit MgCl<sub>2</sub> (10mM Endmolarität) versetzt. Nach 15minütiger Inkubation mit gelegentlich vorsichtigem Schütteln auf Eis wird die Suspension für 15 min bei 2300 x g (3600rpm) zentrifugiert. Der neue Überstand wird schließlich für 45-60min bei 100.000 x g (38.000rpm) in einem 70.1Ti-Rotor in der Ultrazentrifuge aufgetrennt. Der Überstand wird dieses Mal verworfen und das Pellet mit 0,5ml Puffer B versetzt. Mit einer Pasteurpipette wird das Pellet angesaugt und in den Dounce Homogenisator überführt. Nach vorsichtigem Homogenisieren wird die Suspension auf 4,5ml einer 35%igen Saccharoselösung geladen und für 2 h bei 68.000 x g (26.500rpm) in einem 28.1 Swing Rotor zentrifugiert. Anschließend wird die Interphase samt der über ihr liegenden Phase abpipettiert und mit Puffer A verdünnt bis die Saccharosekonzentration ungefähr 8 % beträgt. Eine weitere einstündige Zentrifugation bei 100.000 x g im 70.1Ti Rotor in der Ultrazentrifuge pelletiert die Membranfraktion (PM-Fraktion), die schließlich in minimalen Volumen 1xPBS aufgenommen wird. Für eine spätere Weiterverarbeitung wird sie in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

**Abbildung 2: Schema der Plasmamembran-Anreicherung**

## 2.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Western Blot

### Material

#### Geräte und Verbrauchsmaterial:

SDS-PAGE Gelapparaturen  
 Blotting Apparaturen  
*Protran Nitrocellulose Transfer Membrane*  
 Whatman Papier  
 Hyperfilm ECL  
 Filmkassette  
 Curix 60 Entwicklmaschine

*Bio-Rad Laboratories*, München  
*Bio-Rad Laboratories*, München  
*Schleicher & Schüll Bioscience*, Dassel  
 Hersteller unbekannt  
*Amersham Biosciences Europe*, Freiburg  
*Dr. Goos-Suprema*, Heidelberg  
 Agfa, Köln

#### Substanzen:

10% Ammoniumperoxidsulfat (APS)  
 37,5% Polyacrylamid  
 99% TEMED  
*Precision Plus Protein dual color standards*  
*ECL plus Western Blotting Detection Reagents*

*Roth GmbH*, Karlsruhe  
*Bio-Rad, Laboratories*, München  
*Roth GmbH*, Karlsruhe  
*Bio-Rad Laboratories*, München  
*Amersham Biosciences Europe*, Freiburg

#### Puffer:

**5x Sample-Buffer (Probenpuffer):**

5 ml Glycerin (99%)  
1,5 g SDS  
1 ml 0,25% BPB  
H<sub>2</sub>O ad 7,5 ml  
2,5 ml Mercaptoethanol

**4x Lower Buffer:**

1,5M Trizma Base  
10% SDS  
→ pH 8,8 einstellen

**4xUpper Buffer:**

0,5M Trizma Base  
10% SDS  
→ pH 6,8 einstellen

**15% Trenngel (Volumen 17,36ml):**

ddH <sub>2</sub> O	5,97ml
4x Lower Buffer	4,33ml
PAA	7ml
APS	42,2µl
TEMED	19,1µl

**6% Sammelgel (Volumen: 12,94ml)**

ddH <sub>2</sub> O	7,4ml
4x Upper Buffer	3,3ml
PAA	2,1ml
APS	128,1µl
TEMED	17,1µl

**10x Running Buffer:**

250mM	Trizma Base
10%	SDS
2M	Glycin

**Standard Coomassie Brilliant Blue G:**

300 ml Brilliant Blue G Konzentrat  
ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

**Entfärber-Lösung:**

20% Methanol  
7% Essigsäure  
73% dH<sub>2</sub>O

**Staining-Lösung für kolloidales Coomassie:**

40%           Methanol  
10%           Essigsäure

Kolloidales Coomassie G-250 (Stocklösung):

a) 2%           Phosphorsäure  
   10%          Ammoniumsulfat  
      ad 980ml ddH<sub>2</sub>O  
b) 1g CBB G-250 in 20ml ddH<sub>2</sub>O  
Lösung a) in b) lösen

Färbelösung für kolloidales Coomassie:

4/5 Stocklösung + 1/5 Methanol  
Immer frisch ansetzen.

Entfärberlösung für kolloidales Coomassie:

25% Methanol in ddH<sub>2</sub>O

Western Blot:

10x Transferpuffer:  
250mM        Trizma Base  
0,4%         SDS  
2M            Glycin

Ponceau-Lösung:

0,2% Ponceau S  
1% Essigsäure  
in dH<sub>2</sub>O

Waschpuffer:

1xPBS/0,5% Tween-20

Blockierungslösung:

5% Milchpulver in 1xPBS/0,5% Tween-20  
6,25ml

Stripping-Lösung:

6,25ml        1M Tris-HCl (pH6,8)  
20ml          SDS, 10%  
73,75ml       ddH<sub>2</sub>O  
700µl         β-Mercaptoethanol

*Primär- und Sekundärantikörper*

(In 0,5% Milchpulver in 1xPBS/0,5% Tween-20)

α-ICAM-1 (H-108)       polyklonal, Kaninchen, 200µg/ml       (einzusetzen 1:500)

$\alpha$ -CD3 $\epsilon$ (FL-207)	polyklonal, Kaninchen, 200 $\mu$ g/ml	( „ )
$\alpha$ -Calnexin (H-70)	polyklonal, Kaninchen, 200 $\mu$ g/ml	( „ )
$\alpha$ -Tom40 (H-300)	polyklonal, Kaninchen, 200 $\mu$ g/ml	( „ )
$\alpha$ -Ku86 (H-300)	polyklonal, Kaninchen, 200 $\mu$ g/ml	( „ )
	alle von Santa Cruz Inc., Heidelberg	
$\alpha$ - $\beta$ -Actin (C4)	monoklonal, Maus, Konz. nicht angegeben. (einzusetzen 1:5000)	
	ICN Biomedical, Inc., Ohio, USA	
$\alpha$ -Nuclear Pore (Ab-2)	monoklonal, Maus, Konz. nicht angegeben. (einzusetzen 1:300)	
	Oncogene Research products, Schwalbach/Ts	
$\alpha$ -Lck (MOL171)	monoklonal, Maus, 200 $\mu$ g/ml	(einzusetzen 1:100)
	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA	
$\alpha$ -MT5-MMP	polyklonal, Kaninchen, 1mg/ml	(einzusetzen 1:1000)
	Neuromics, Northfield, MN, USA	
$\alpha$ -Kaninchen IgG	polyklonal, Ziege, 100 $\mu$ g/ml	(einzusetzen 1:10 000)
	Santa Cruz Inc., Heidelberg	
$\alpha$ -Maus IgG	polyklonal, Ziege, 100 $\mu$ g/ml	(einzusetzen 1:10 000)
	Santa Cruz Inc., Heidelberg	

## Methode

Die Gelplatten werden in die Gelapparatur eingesetzt. Als erstes wird das Trenngel gegossen und mit Aceton überlagert um eventuelle Unebenheiten zu vermeiden. Ist das Trenngel polymerisiert, wird das Aceton entfernt, das Sammelgel gegossen und die Kämme eingesetzt. In der Zwischenzeit sollten die Proteinproben vorbereitet werden. Dabei werden sie mit 5x Probenpuffer versetzt und für 5min bei 95°C inkubiert. Danach werden die Proben kurz abzentrifugiert. Ist auch das Sammelgel polymerisiert, wird in den Gelapparaturbehälter 1x Laufpuffer gegeben und die Kämme gezogen. Nach kurzem Ausspülen kann man nun die Proteinproben hineinpipettieren. Um die Proteingrößen bestimmen zu können, wird eine Proteinleiter mitaufgetragen. Der Gellauf erfolgt bei 130V für ca. 100min. Der Lauf wird je nach Bedarf und Größe der Proteine gestoppt.

Nach Beendigung kann das Gel Coomassie gefärbt werden. Für eine Coomassiefärbung stehen zwei verschiedene Prozeduren zur Verfügung. Um geringe Proteinmengen anfärben zu können empfiehlt sich eine kolloidale Färbung. Das Gel wird dabei zunächst mit 40%igem Methanol und 10%iger Essigsäure (Staining-Lösung) fixiert. Anschließend erfolgt die Färbung meist über Nacht. Erscheint das Gel später ausreichend gefärbt, wird es in 25%igem Methanol kurz entfärbt bis die Banden klar zu erkennen sind. Es kann für eine stabile Lagerung in 25%igem Ammoniumsulfat aufbewahrt werden. Die Färbung mit dem Standard Coomassie gilt als weniger sensitiv. Das Gel wird sofort in die Coomassie Brilliant Blue Färbelösung gelegt und für 30 bis 60min inkubiert. Die Entfärbung erfolgt hier ÜN.

Sollen die aufgetrennten Proteine mit Antikörper inkubiert werden, wird das Gel zunächst in einer vorbereiteten Blotting-Apparatur mit einem passenden Stück Nitrocellulose zusammen geblottet (meist für 1h bei 100V). Nach dem Transfer wird die Membran herausgenommen und die einzelnen Banden der Proteinleiter mit einem Kugelschreiber markiert. Um zu kontrollieren ob der Transfer geklappt hat, kann der Blot mit Ponceaulösung für 1-2min inkubiert werden. Anschließend sollte der Blot zunächst in dH<sub>2</sub>O und später mit dem Waschpuffer entfärbt werden. Zur Blockierung von unspezifischen Antikörperbindungen wird der Blot für 1h bei RT in 5%iger Milch geschüttelt (alternativ kann die Inkubation auch bei 4°C ÜN erfolgen), anschließend dreimal für 5min mit Waschpuffer gewaschen und schließlich mit dem Erst-Antikörper mit entsprechender Konzentration inkubiert. Die Inkubation wird entweder für 1h bei RT oder ÜN bei 4°C durchgeführt. Es folgt ein dreimaliges Waschen für je 10min. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper entspricht der gleichen Prozedur. Jedoch sollte hier die Inkubationszeit von 1h nicht überschritten und ÜN bei 4°C vermieden werden. Nach dem letzten Waschgang wird auf den Blot für 1min das Substrat (ECL-Lösung) für die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase gegeben. Der Blot wird eingeschweißt und schließlich in eine Filmkassette gelegt. Die Entwicklung eines Filmes in der Dunkelkammer dauert je nach Signalstärke, wobei die Exposition nur bis zu 20min möglich ist, da das Substrat nicht länger stabil ist. Soll der Blot mit weiteren spezifischen Antikörpern inkubiert werden, wird der Blot mit der Stripping-Lösung versetzt und für eine halbe Stunde bei 57°C inkubiert. Anschließend folgt eine dreimalige Waschung mit 1xPBS-T für je 5 min. Die weitere Vorgehensweise entspricht der ersten Prozedur.

## 2.4. Immunisierung zweier Kaninchen mit HuT78-Oberflächenpräparat

### Material

Chinchilla Bastard Kaninchen	<i>Ivanovas</i> , Kisslegg bzw. <i>Eurogentec</i> , Seraing, Belgien
Komplettes Freundesches Adjuvans	<i>Sigma-Aldrich, Inc.</i> , Saint Louis MO, USA
Inkomplettes Freundesches Adjuvans	<i>Sigma-Aldrich, Inc.</i> , Saint Louis MO, USA

### Methode

Die Immunisierung eines Kaninchens erfolgt subkutan. Zur Verstärkung der Immunreaktion wird das Protein mit dem kompletten Freundeschen Adjuvans beim ersten Mal injiziert.

Während der Boostreaktionen wird das inkomplette Freundsche Adjuvans verwendet. Zwischen der ersten und der zweiten Injektion sollten vier Wochen vergehen. Anschließend können mehrere Boostreaktionen im Abstand von zwei Wochen durchgeführt werden. Jeweils vor den Injektionen wird dem Kaninchen Blut aus einer Ohrvene entnommen, das in ein Serumröhrchen aufgefangen wird. Die Röhrchen werden stehen gelassen, bis das Blut geronnen ist. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 3000rpm für 10min. Das Serum wird schließlich vorsichtig abgenommen ohne das Pellet mit den Erythrozyten zu berühren. Es kann nun bei -20°C bis zur weiteren Verwendung weggefroren werden. Die Immunisierung und die Blutentnahme des ersten Kaninchens wurde von Mitarbeitern des zentralen Tierlabors des DKFZ und die Immunisierung des zweiten Kaninchens wurde von der Firma Eurogentec in Seraing, Belgien durchgeführt.

## 2.5. Test der Seroreaktivität mittels ELISA

### Material

#### *Geräte und Verbrauchsmaterial:*

Elektron. 1-Kanal Dispenser, 50-1200µl	<i>Biozym Scientific GmbH</i> , Hess. Oldendorf
ELISA Reader	<i>µ-Quant Deelux Labortechnik</i> , Gerdenstorf
Nunc-Immuno Platten, polysorb	<i>Nunc Brand Products</i> , Wiesbaden

#### *Puffer und Substanzen:*

Coating Puffer:

1M NaHCO<sub>3</sub>

1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

→ pH 9,6, wird nur mit den beiden Lösungen eingestellt ( 1 Teil 0,05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Lauge) + 4 Teile NaHCO<sub>3</sub> (Säure)), Lagerung bei RT

Blockpuffer:

1 x PBS

0.05% Tween 20

0.2% Casein

→ 50 sec in die Mikrowelle, damit es sich löst.

Tetramethylbenzidine (TMB):

10mg/ml in DMSO

0,1M Natriumacetat, pH 6,0, bei 4°C lagern

Substratpuffer:

0,1M Natriumacetat, pH9,6

1% TMB

0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



10xPBS:

1,37M	NaCl
30mM	KCl
1,5mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
80mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O

Waschpuffer:

1xPBS/0,05% Tween-20

Stopplösung:

1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

$\alpha$ -Kaninchen IgG-Antikörper HRP-gekoppelt, polyklonal, Ziege, 100 $\mu$ g/ml *Santa Cruz Inc.*, Heidelberg

## Methode

Die 96-Loch-Platte wird zunächst mit dem Antigen in Coating Puffer versetzt, so dass jedes Well mit 100 $\mu$ l ( $\rightarrow$  1,5 $\mu$ g Protein) gefüllt ist. Die Platte wird bei 4°C ÜN inkubiert. Am nächsten Tag wird der Überstand abgeschüttet. Pro Loch werden nun 180 $\mu$ l Blockpuffer pipettiert und die Platte 1h bei RT stehengelassen. Anschließend soll die Platte dreimal mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen werden. Dabei wird die Platte einfach in eine größere Schale mit vorgelegtem Waschpuffer getunkt, im Waschbecken ausgeschüttet und zum Trocknen auf Papierhandtücher vorsichtig ausgeklopft. Anschließend folgt die Seruminkubation. Dafür wurden von den einzelnen Antiseren bereits Verdünnungsreihen angelegt, in diesem Fall 1:100, 1:300, 1:900, 1:2700, 1:8100, 1:24300, 1:72900 und als Negativkontrolle Blockpuffer (s. untere Tabelle). Zu Verdünnung der Seren wird der Blockpuffer verwendet. Pro Verdünnung werden Duplikate aufgetragen. Die Inkubation erfolgt auf dem Schüttler für 1h bei RT. Danach wird die Platte erneut dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Als Sekundär-Antikörper wird ein Anti-Kaninchen IgG Antikörper aus Ziege gekoppelt mit einer Peroxidase in einer Verdünnung von 1:10.000 im Blockpuffer in einem Volumen von 100 $\mu$ l durchgeführt. Die Inkubation erfolgt für 1h bei RT auf dem Schüttler. Gestoppt wird sie wieder durch dreimaliges Waschen. In der Zwischenzeit sollte das Substrat vorbereitet sein. Dafür werden 10ml Substratpuffer mit 100 $\mu$ l TMP und 1 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt. Pro Loch werden schließlich 100 $\mu$ l pipettiert und für 8min bei RT im Dunklen inkubiert. Die Reaktion wird mit 50 $\mu$ l 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Messung erfolgt im ELISA Reader bei 450nm.

**Tabelle 4: Pipettierschema und Verdünnungsreihe der getesteten Antiseren**

Prä-Immunserum		Antiserum 1		Antiserum 2		Antiserum 3		Antiserum 4		Endserum	
1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100	1:100
1:300	1:300	1:300	1:300	1:300	1:300	1:300	1:300	1:300	1:300	1:300	1:300
1:900	1:900	1:900	1:900	1:900	1:900	1:900	1:900	1:900	1:900	1:900	1:900
1:2700	1:2700	1:2700	1:2700	1:2700	1:2700	1:2700	1:2700	1:2700	1:2700	1:2700	1:2700
1:8100	1:8100	1:8100	1:8100	1:8100	1:8100	1:8100	1:8100	1:8100	1:8100	1:8100	1:8100
1:24300	1:24300	1:24300	1:24300	1:24300	1:24300	1:24300	1:24300	1:24300	1:24300	1:24300	1:24300
1:72900	1:72900	1:72900	1:72900	1:72900	1:72900	1:72900	1:72900	1:72900	1:72900	1:72900	1:72900
Blockierungspuffer als Blank											

## 2.6. Immunzytochemie

### Material

#### **Verbrauchsmaterial:**

Objektträger  
 Deckgläser 22x22mm  
 Fettstift Dako Pen  
 Normal goat serum  
 Vectastain ABC kit  
 Alkaline phosphatase Substrate Kit I  
 Mayer's Hämalun Lösung  
 Histogel

R. Langenbrinck, Emmendingen  
 R. Langenbrinck, Emmendingen  
 DAKO, Glostrup, Dänemark  
 Vector laboratories Inc., Burlingame, CA, 94010  
 Vector laboratories Inc., Burlingame, CA, 94010  
 Vector laboratories Inc., Burlingame, CA, 94010  
 AppliChem, Darmstadt  
 Linaris, Bettingen am Main

#### **Puffer:**

3,7% Formaldehyd in 1xPBS  
 1xPBS + 0,2% TritonX-100  
 1xPBS + 0,1% TritonX-100  
 1xPBS + 0,1% TritonX-100 + 0,5% Milchpulver  
 100mM Tris-HCl, pH 8,5

### Methode

Für die Herstellung der Zytospins wird zunächst die Zellkonzentration gemessen. Auf jeden Objektträger sollen  $1 \times 10^5$  Zellen aufgetragen werden. Dementsprechend werden Volumina

gewählt und schließlich die Zellen für 3 min bei 1500rpm in die Zytospin-Kammer zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und schließlich die Kammer in die Zentrifuge gesetzt. Kurz vor der eigentlichen Zentrifugation wird der Ring und Aufsatz abgenommen. Die Zentrifugation der Zellen auf die Objektträger erfolgt schließlich für 1min bei 3000rpm. Die Zellen werden in 3,7% Formaldehyd (in 1xPBS) für 15 min bei 4°C fixiert. Die Zytospins können nun auch für längere Zeit bei -20°C gelagert werden.

Für eine Immunzytochemie werden die Objektträger zunächst kurz unter dem Abzug getrocknet und anschließend für 4min in 1xPBS gewaschen. Die Zytospins können dann optional für 5 min mit 1% SDS behandelt werden. Bei Antikörper, die vorwiegend ihr Target-Protein im denaturierten Zustand erkennen, ist die SDS-Behandlung von Vorteil.

Die Zytospin werden für weitere 2 min in 1xPBS/0,2% TritonX-100 inkubiert um die Zellen zu permeabilisieren. Weiter werden sie für jeweils 4min in 1xPBS gewaschen. Zur Blockierung von unspezifischen Bindungen werden die Zellen mit 5% Normal goat serum für 20min inkubiert. Anschließend beginnt die Inkubation mit dem Primär-Antikörper in angemessener Konzentration, die über Nacht bei 4°C oder auch nur 1h bei RT dauern kann.

Die Objektträger werden nun einmal mit 1xPBS/0,1% TritonX-100 und einmal mit 1xPBS/0,1% TritonX-100/0,5% Milch für jeweils 5min gewaschen. Die Inkubation mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper mit einer Konzentration von 1:1000 erfolgt für 30min bei RT. Der Waschgang entspricht dem nach der Inkubation mit dem Primär-Antikörper. Schließlich wird das ABC-Reagenz für 30min zugegeben, das eine ½ Stunde zuvor angesetzt worden ist. Das Reagenz beinhaltet Avidin sowie biotinylierte Meerrettich-Peroxidase H, die einen Komplex bilden und an den Sekundär-Antikörper binden.

Die Objektträger werden dreimal mit 1xPBS für 5min gewaschen und kurz mit 100mM Tris/HCl, pH 8,5 gespült.

Die Farbreaktion erfolgt durch Zugabe des AP-Substrats bei RT im Dunkeln für 20 min. Erscheint die Färbung stark genug, werden die Objektträger mit 1xPBS gespült und dreimal mit MQ-H<sub>2</sub>O für 2min jeweils gewaschen. Mit Hämalaun-Inkubation wird die DNA in den Kernen angefärbt, das eine Erleichterung ist bei der Untersuchung der Zellen im Lichtmikroskop. Eingedeckelt werden schließlich die Zellen mit Histogel.

## 2.7. Immunpräzipitation

### Material

#### **Geräte:**

Überkopfrotor, Model 34528  
Optima™ TL Ultrazentrifuge  
Rotor TLA120.2

*Snijders Scientific*, Tilburg, Holland  
*Beckman*, Fullerton, CA, USA  
*Beckman*, Fullerton, CA, USA

#### **Verbrauchsmaterial:**

Protein A-Agarose beads  
Complete Mini, EDTA-free

*Roche Diagnostics*, Penzberg  
*Roche Diagnostics*, Penzberg

#### **Lösungen/Puffer:**

100mM Tris/HCl, pH 8,0  
100mM Tris/HCl 0,5M NaCl, pH 8,0  
100mM Natrium-Boratpuffer, pH 9,0  
20mM Dimethylpimelimidate (bei 10ml, 0,05g)  
200mM Ethanolamin  
100mM Glycinpuffer, pH 2,5-3  
Tris Base, pH 8

#### Immunpräzipitationspuffer:

50mM Tris/HCl, pH 7,5  
120mM NaCl  
0,1% Tween-20  
1mM EDTA, pH 8,0  
0,25% Gelatine  
0,02% Natriumacid  
und bei einem Volumen von 50ml 1 Proteinase-Inhibitortablette (Complete Mini, EDTA-frei)

#### Solubilisierungspuffer:

20mM Tris/HCl, pH 7,5  
120mM NaCl  
0,1% Tween-20  
1mM EDTA, pH 8,0  
0,25% Gelatine  
0,02% Natriumacid  
und bei einem Volumen von 50ml 1 Proteinase-Inhibitortablette (Complete Mini, EDTA-frei)

### Methode

#### ***Kopplung der Antikörper aus dem Serum mit den Protein A-Agarose beads***

Die Beads werden zunächst dreimal für je 15min mit 100mM Tris/HCl bei RT im Überkopfrotor gewaschen und für 5min bei 2000rpm abzentrifugiert. Anschließend werden

die Beads mit 100mM Tris/HCl, 0,5M NaCl, pH 8 für 10min bei RT im Überkopfroter gewaschen und wiederum für 5min bei 2000rpm abzentrifugiert. Bevor das Serum zugegeben wird, sollte der pH-Wert auf 8 getestet werden, da die Bindung im leicht alkalischen Bereich stattfindet. 1ml Protein A-Agarose bindet 10 bis 20mg pures IgG, das einem Volumen von ungefähr 2ml Serum entspricht. Die Inkubation wird bei RT auf dem Überkopfroter durchgeführt und sollte 2h dauern. Die ungebundenen Antikörper und auch andere Serumproteine werden durch eine Zentrifugation für 5min bei 2000rpm abgetrennt und können zur Kontrolle aufbewahrt werden. Die nun mit Antikörper gekoppelten Beads werden schließlich fünfmal für 5min mit 100mM Natrium-Boratpuffer, pH 9,0 gewaschen und danach mit 100mM Natrium-Boratpuffer, pH 9,0 und 20mM Dimethylpimelimidate für 30min inkubiert. Dimethylpimelimidate sorgt für eine Festigung der Bindung/Vernetzen von Antikörper an Protein A (Crosslinking). Anschließend werden die Beads zweimal für je 2min mit 200mM Ethanolamin gewaschen und noch für weitere 2h inkubiert. Ethanolamin stoppt den Kreuzvernetzungsprozess. Um unspezifische Bindungen zu lösen können die Beads nun optional mit 100mM Glycinpuffer, pH 3,0 gewaschen werden. Zum Schluß werden die Antikörper gekoppelten Protein A-Agarose Beads mit dem Puffer äquilibriert, der auch für die Immunpräzipitation verwendet wird. Die Beads können aber auch bei einer längeren Lagerung in 1xPBS aufgenommen und bei 4°C gelagert werden.

### ***Immunpräzipitation (IP)***

Um eine Vereinzelung der Proteine aus der Membran zu erreichen, kann das Oberflächenpräparat zuvor solubilisiert werden. Dafür wird es mit dem Solubilisierungspuffer in einem Überschuss versetzt, das 0,1% Tween-20 enthält, und für 2h bei 4°C im Überkopfroter inkubiert. Das Abzentrifugieren der nicht solubilisierten Proteine erfolgt bei 50.000rpm für 45min bei 4°C im TLA120.2 Rotor. Der entstandene Überstand ist nun einsatzbereit für die IP.

Ein weiterer optionaler Schritt ist das sogenannte Vorreinigen der Proteine mit ungekoppelten Beads. Dafür werden 50µl Beads mit der Proteinprobe versetzt und ÜN bei 4°C in den Überkopfroter gesetzt. Anschließend werden die Beads bei 13.000rpm für 1min abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und kann nun für die IP verwendet werden. Eine entsprechende Menge an Ak-gekoppelten Beads wird nun mit der Proteinprobe gemischt und ÜN bei 4°C in den Überkopfroter gesetzt. Nach der Inkubation werden die ungebundenen Proteine durch eine Zentrifugation für 7-10min bei 2000rpm abgetrennt und können zur

Kontrolle weggefroren werden. Die Ak-gekoppelten Beads mit den gebundenen Proteinen werden schließlich mit IP-Puffer dreimal für je 4min gewaschen.

Die anschließende Elution, d.h. die Trennung der gebundenen Proteine von den Antikörpern, findet durch einen angesäuerten pH-Wert statt. Dabei werden die Beads für ca. 10min bei 4°C mit einem guten Überschuss an 100mM Glycinpuffer, pH 2,5 inkubiert. Durch zwei Zentrifugationsschritte bei je 5000rpm für 15min werden schließlich die eluierten Proteine von den Ak-gekoppelten Beads getrennt und können anschließend mit Hilfe von TCA gefällt werden.

Um aus dem Eluat eventuelle leichte und schwere Ketten der IgG-Moleküle zu entfernen, werden die Eluate mit 500µg ungekoppelten Beads für 1h bei RT inkubiert und schließlich bei 13.000rpm für 2min zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und entweder weiter verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

### ***Identifizierung der präzipitierten Proteine mit den massenspektrometrischen Analysen MALDI-TOF und ESI-MS/MS***

Alle Analysen wurden in der Abteilung „Zentrale Proteinanalytik“ im Labor von Dr. Martina Schnölzer des DKFZ durchgeführt.

Bei einer MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) und ESI-MS/MS (Electrospray ionization-mass spectrometry) Analysen wird die Proteinprobe zunächst mit einer sequenz-spezifischen Protease (in diesem Fall Trypsin) verdaut und die entstehenden Peptide extrahiert. Diese werden anschließend auf eine kristallinen Lichtabsorbierenden Matrix beladen und ionisiert. Die Ionisierung erfolgt mit kurzen Laserimpulsen. Um nun die Masse der entstandenen Ionen bestimmen zu können, werden sie in einem elektrischen Feld über eine bestimmte Distanz hinweg in Richtung eines Detektors beschleunigt. Die Zeit, die das Ion für die Strecke zum Detektor benötigt, hängt dabei von seinem jeweiligen Masse/Ladungsverhältnis ab. Mit Ermittlung der Masse aller Peptide des verdauten Proteins entsteht ein einzigartiges Profil, das schließlich in Protein-Datenbankenanalysen für seine Identifizierung verwendet werden kann.

Anders als bei MALDI-TOF Analysen wird bei ESI-MS/MS Analysen ein kontinuierlicher Ionenfluß generiert, in dem die Peptide im löslichen Zustand aus einer Kapillarnadel ausgestoßen werden, die unter hoher elektrischer Spannung steht. ESI-MS/MS-Analysen gehen außerdem über die Bestimmung der Peptidmasse hinaus. Ein spezifisches Peptid wird ausgewählt und durch die sogenannte Kollisions-induzierte Dissoziation (CID, collision-induced dissociation) fragmentiert. Mit Ermittlung des Masse/Ladungs-Verhältnisses der

Fragmente kann die Sequenz des Peptides ermittelt werden. Der Vorteil gegenüber dem MALDI-TOF liegt in dieser weiteren Analyse. Denn auf diese Weise können mehrere Peptide aus einem Proteinmix identifiziert werden, so dass hier nicht nur das prominenteste Protein, sondern auch Proteine mit geringeren Mengen identifiziert wurden.

## 2.8. SEREX (Serological identification of antigens by recombinant expressed cloning)

### Material

#### **Geräte:**

Brutschrank bei 37°C	<i>Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold</i>
Brutschrank bei 40°C	<i>Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold</i>
PCR-Gerät	s. Material und Methoden „RNA-Isolierung,...“
Agarosegel-Apparatur	s. Material und Methoden „RNA-Isolierung,...“

#### **Verbrauchsmaterial:**

Platten, 145/20mm	<i>Greiner BioOne GmbH, Kremsmünster, Österreich</i>
<i>Nitrocellulose Blotting Membranes, 0,45µm</i>	<i>Sartorius AG, Göttingen</i>
<i>Protran Nitrocellulose Transfer Membrane, 0,45µm</i>	<i>Schleicher&amp;Schüll, Dassel</i>
Matrix Affinity Adsorbant, Glutardialdehyde activated	<i>Roche Diagnostics, Mannheim</i>

#### **Bakterienstämme:**

XL1-Blue MRF'	<i>Stratagene, La Jolla, CA, USA</i>
Tetrazyklin resistent, SupE44 Mutation, F' Episom mit ΔM15 lacZ Gen, Gene für F' Pilibildung, lac Repressor	
SOLR	<i>Stratagene, La Jolla, CA, USA</i>
Kanamycin resistent, nichtsuppressiver Stamm	

#### **Phagen:**

SeAx cDNA Phagenbank hergestellt von Dr. Tanja Hartmann, cDNA Inserts in pBluescript® SK-Phagemid verpackt in λZAPII-Vektor	<i>Stratagene, La Jolla, CA, USA</i>
ExAssist™ Helper Phage	<i>Stratagene, La Jolla, CA, USA</i>
Enthält eine amber mutation	

#### **Lösungen:**

Maltose-Stamm (10%)
Maltose: 10 g in 100 ml; autoklavieren (oder sterilfiltrieren)
Maltose Gebrauchslösung: 1 ml in 50 ml (⇒ 0.2% final)

MgSO<sub>4</sub>-Stamm (0,2 M)

MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O: 4.92 g in 100 ml; autoklavieren

*Gebrauchslösung*: 1:20 verdünnen; ansonsten als Zusatz

10% Natriumacid

0,5M IPTG → sterilfiltrieren, portionieren (1 ml), bei -20°C lagern

### **Medien:**

NZY-broth:

NaCl 5g

Bacto Yeast 5g

MgSO<sub>4</sub> 2g

NZ Amine 10g

mit H<sub>2</sub>O auffüllen, pH 7,5, autklavieren

NZY-Agar:

NZY-broth

1,5% Agar → autoklavieren

NZY-Top-Agar:

NZY-broth

0,7% Agarose → autoklavieren

LB-Medium:

Bacto Trypon 10g

Bacto Yeast 5g

NaCl 10g

→ mit 1l dH<sub>2</sub>O auffüllen, pH 7,0, autoklavieren

LB-Agar

Pro 500ml LB-Medium → 7.5 g Agar, autoklavieren

LB-Agar mit Antibiotika:

1,5% Agar → auf 50°C abkühlen, dann Antibiotikum dazugeben (Menge für 500 ml):

Stamm-Konz.	<i>final</i>	<i>endverdünnt</i>
-------------	--------------	--------------------

Tetracyclin	5 mg/ml	5 µg/ml
-------------	---------	---------

Ampicillin	100 mg/ml	150 µg/ml
------------	-----------	-----------

Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
-----------	----------	----------

→ Platten gießen; aufbewahren bei 4°C, vor Benutzung auf 37°C

LB-komplett:

0,04M MgSO<sub>4</sub>

2,5% Maltose

LB-Medium

### **Puffer:**

SM-Puffer:

5,8g NaCl

2g MgSO<sub>4</sub> × 7H<sub>2</sub>O



50ml 1M Tris-HCl  
5ml 2% Gelatine  
auf 1l dH<sub>2</sub>O, autoklavieren

Verdünnungslösung:  
0,2% Milchpulver  
0,025% Natriumacid  
1x TBS

10xTBS, pH 7,5:  
150mM NaCl  
50mM Trizma base  
→ ad 1l dH<sub>2</sub>O, mit HCl auf pH 7,5

10x TBST /0,5%Tween-20:  
5 ml Tween-20 in 1l 10xTBS

1M Tris HCl, pH 7,5

50mM Tris pH 3,0

Blockierungslösung:  
1xTBS/5%Milchpulver

***Entwicklungslösungen:***

10xCDS:  
100mM Tris, pH9,5  
5mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O  
100mM NaCl  
→ pH 9,5

NBT-Stamm:  
500 mg NBT (4°C) in 10 ml 70% DMF lösen  
→ portionieren und bei 4°C und lichtgeschützt aufbewahren

BCIP-Stamm:  
250 mg BCIP (- 20°C) in 5 ml 100% DMF lösen  
→ portionieren und bei -20°C aufbewahren

Entwicklerlösung:  
0,2% NBT  
0,1% BCIP  
1x CDS

***Weiteres Zubehör:***

α-Kaninchen, polyklonal, Ziege, mit AP-gekoppelt

*Santa Cruz Inc.*, Heidelberg

*QIAprep Spin Miniprep Kit*

*Qiagen GmbH*, Hilden

Restriktionsenzyme SmaI, KpnI	<i>BD Biosciences</i> <i>Pharmingen, Heidelberg</i>
One-phor-all buffer plus	<i>Amersham Pharmacia</i> <i>Biotec Braunschweig</i>
Tetrazyklin, Ampicillin, Kanamycin	<i>Sigma Aldrich, Steinheim</i>
<u>Sequenzier-PCR:</u>	
Primer T3	5'-cac aca gga aac agc tat gac cat g -3' (hausintern)
Primer T7	5'-gta aaa cga cgg cca gtg-3' (hausintern)

## Methode

### *Herstellung der SeAx cDNA Phagenbank*

Die Phagenbank wurde von Dr. Tanja Hartmann als Teil ihrer Diplomarbeit hergestellt. Die isolierte mRNA der SeAx Zelllinie wurde zunächst in cDNA umgeschrieben und der komplementäre Zweitstrang synthetisiert. Anschließend erfolgte die Insertion in den ZAPII Vektor der Firma Stratagene. Genauer wurden die cDNA Stücke in die Polylinkerregion des Phagemids pBluescript II SK (-) eingebaut, die Schnittstellen für mehrere Restriktionsenzyme aufweist. Zusätzlich ist sie von je einem T7- und einem T3-RNA-Polymerase Promotor flankiert und liegt im 5'-kodierenden Bereich des lacZ-Gens ohne das Leseraster zu verändern. Kommt es nun zu einem Einbau von Fremd-DNA Fragmenten wird die Synthese von  $\beta$ -Galactosidase unterbrochen. Somit können Bakterien mit  $\beta$ -Galactosidase Aktivität von solchen ohne eine Aktivität unterschieden werden, in dem sie auf einem Nähragar kultiviert werden, dem IPTG und X-Gal zugesetzt sind (Blau/Weiß-Selektion). Desweiteren enthält der pBluescript-Phagemid ein Gen für Ampicillin-Resistenz, das ebenfalls für die Selektion wichtig ist, und einen fl (-) Origin, der beim Ausschneiden des Phagemiden aus dem  $\lambda$ ZAPII-Vektor entscheidend ist (siehe .3. Ausschneiden der cDNA in diesem Kapitel).

### *1) Präabsorption des Kaninchen Antiserums*

Zunächst wird das Serum mit der Verdünnungslösung 1:10 vorverdünnt und präabsorbiert, d.h. von Antikörpern gegen bakterielle oder Bakteriophagen-Proteine gereinigt. Die Präabsorption beginnt mit der sog. mechanischen Säule.

#### *1a) Herstellung einer mechanische Säule*

Das Pellet (ZF 3500 × g, 15 min) einer ÜN-XL 1 Blue Kultur (50ml) wird in 5 ml PBS gelöst, achtmal für 8 sec sonifiziert auf Eis und in ein mit 2g Matrix vorgelegtem 50ml-Falconröhrchen überführt. Die Inkubation erfolgt ÜN in einem Überkopfrötor bei 4°C. Am nächsten Tag wird die Bakteriensuspension durch Stehenlassen der Säule für 1min von der Matrix getrennt und vorsichtig abdekantiert. Die Säulen werden schließlich mit 1xTBS/0,1%Natriumacid gewaschen. Die Säulen können für eine längere Zeit bei 4°C gelagert werden.

Das vorverdünnte Serum mit einem Volumen von 20ml wird auf die Säule gegeben und ÜN oder für mind. 8h bei 4°C im Überkopfrötor inkubiert. Am nächsten Tag wird die Säule kurz stehen gelassen, so dass sich die Matrix vom Überstand trennt. Der Überstand wird auf eine neue mechanische Säule gegeben. Zur Reinigung der verwendeten mechanischen Säule wird sie anschließend dreimal für ½ Stunde mit 50mM Tris-HCl, pH 3 gewaschen, später mit 1xTBS/0,025%Natriumacid gewaschen. Sie kann später wieder benutzt werden (jedoch sollten nicht mehr als 6ml pures Serum pro 2g Matrix eingesetzt werden).

Nach der zweiten mechanischen Säule wird das Serum nun mit lytischen Säulen präabsorbiert.

#### ***1b) Herstellung einer lytischen Säule***

XL 1 MRF Bakterien werden in 50 ml LB-Maltose inkubiert, bis sie eine  $OD_{600}=0.5$  erreichen, anschließend pelletiert und in 2 ml 0,01 M  $MgSO_4$  aufgenommen → Pellet (aufbewahren bei 4°C). Anschließend wird ein kleiner Teil des Pellets mit dem „blauen Phagen“ (leerer Lambda-Vektor) für 4h bei 37°C inkubiert.

Für eine Säule:

LB	5 ml
Maltose	100 µl
MRF-Pellet	200 µl
blauer Phage	500 µl

Später wird der Rest des Pellets zugegeben und für weitere 2h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird die Bakteriensuspension achtmal für je 8sec auf Eis sonifiziert und in ein mit 2g Matrix vorgelegtes 50ml-Falconröhrchen überführt. Die Inkubation erfolgt 4h bei RT oder ÜN bei 4°C in einem Überkopfrötor. Danach wird die Bakteriensuspension vorsichtig abdekantiert und die Säule gewaschen mit 100 ml 1xTBS/0.1% Natriumacid. Die Säule kann bei 4°C gelagert werden.

Das bereits mit mechanischen Säulen präabsorbierte, vorverdünnte Serum wird auf die lytische Säule gegeben und die Präabsorption erfolgt wie bei den mechanischen Säulen nach gleicher Prozedur. Die verwendeten Säulen können wie die mechanischen Säulen gewaschen und wieder verwendet werden. Anschließend folgt die Präabsorption mit lytischen Folien.

#### ***1c) Herstellung von lytischen Folien***

Eine entsprechende Konzentration des blauen Phagen wird mit 600 µl MRF,  $OD_{600}=0.5$  gemixt und für 15min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Suspension mit Top-Agar versetzt und auf eine Agarplatte verteilt, so dass die Platte gleichmäßig von der Top-Agar-Bakteriensuspension bedeckt ist. Die Transfektion erfolgt nun ÜN bei 37°C. Am nächsten Tag werden überwachene Platte mit einem passenden Stück Nitrocellulose überdeckt und für 3-4h bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die

Nitrocellulose vorsichtig von der Platte abgezogen und zum Trocknen auf Whatman-Papier gelegt. Die Folien können auch für einige Tage bei RT trocken und lichtgeschützt gelagert werden.

Die vorverdünnten Seren werden nun auf die mit 1xTBS angefeuchteten lytischen Folien gegeben und für min. 8h oder ÜN bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Diese Prozedur wird viermal durchgeführt. Im Gegensatz zu den Säulen sind die Folien nicht wieder verwendbar.

Insgesamt werden zur Präabsorption von 2ml Serum 2 mechanische Säulen, 2 lytische Säulen und 4 lytische Folien verwendet.

Um zu testen, ob die Präabsorption ausreichend war, wird ein entsprechendes Volumen des vorverdünnten Serum endverdünnt und ein Testlauf durchgeführt. Ist der Hintergrund noch zu stark, wird das vorverdünnte Serum mit weiteren lytischen Folien präabsorbiert. Sieht die getestete Folie jedoch sauber aus, wird das komplette vorverdünnte Serum 1:10 oder nur 1:5 endverdünnt.

## **2) Transfektion und SEREX**

Zunächst wird eine XL1 Blue MRF Kulturplatte (LB-Platte mit Tetrazyklin) angesetzt, eine einzelne Kolonie gepickt, in 50 ml LB-Maltose-MgSO<sub>4</sub> überführt und in einen 37°C-Schüttler ÜN zum Wachsen gesetzt. Am nächsten Tag werden davon 200 µl mit 50ml LB-Maltose-MgSO<sub>4</sub> versetzt und in 37°C geschüttelt bis die Bakteriensuspension eine OD<sub>600</sub> von 0.5 erreicht hat. Die Kultur kann nun bei 4°C für eine Woche aufbewahrt und verwendet werden.

Für die Transfektion werden zunächst Petrischalen mit NZY-Agar zum Vorwärmen in den 37°C Inkubator gestellt. Für einen Ansatz von 20 großen Petrischalen werden 3ml (d.h. pro Platte 600µl) der MRF-Kultur OD<sub>600</sub>=0,5 mit einer entsprechenden Menge der Phagenbank (die zuvor austitriert worden ist) versetzt und für 15min bei 37°C inkubiert. Bereits zuvor ist eine Flasche mit NZY-Top-Agar in der Mikrowelle vorsichtig aufgeköcht und im 50°C-Wasserbad flüssig gehalten worden. Während der Inkubationszeit wird das Top-Agar auf ca. 37°C abgekühlt. Nach den 15min wird der Transfektionsansatz mit Top-Agar (pro Platte 7-8ml) und IPTG (0,5mM) versetzt, vorsichtig vermischt und gleich in die Schale gegossen, so dass sich der Agar gleichmäßig verteilt. Bis der Agar sich verfestigt hat, werden sie bei RT stehengelassen und anschließend über Kopf ÜN in den 37°C Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag sollten gleichmäßig und dicht Phagenplaques in der Schale zu sehen sein. Ist dies der Fall wird eine zurechtgeschnittene Nitrocellulosemembran aufgelegt und mit 3 Löchern markiert. Der Transfer der Proteine aus dem Agar in die Membran erfolgt in 3-4h bei

37°C. Anschließend wird die Folie vorsichtig abgezogen, so dass das Top-Agar sich nicht löst. Sollte sich der Top-Agar mitablösen, werden die Agarreste mit auf links getragenen Handschuhe vorsichtig von der Folie abgestreift. Die Folien werden anschließend dreimal mit 1xTBST in einer Glasschale auf einem Schüttler gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, werden die Folien in Blockierungslösung für 1h bei RT inkubiert. Der nachfolgende dreimalige Waschgang wird dieses Mal mit 1xTBS je 10min durchgeführt.

Die Inkubation der Blots mit dem endverdünnten Serum erfolgt schließlich ÜN bei 4°C. Für eine große Folie werden dabei ca. 20ml Serum benötigt. Am nächsten Tag wird das Serum vorsichtig von den Folien abdekantiert, so dass möglichst kein großer Verlust entsteht. Das Serum wird bei 4°C aufbewahrt. Die Folien werden in 1xTBS gesammelt und wieder dreimal für je 10min gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation der Folien mit dem Sekundärantikörper, in diesem Fall ein Goat-Anti-Kaninchen IgG Antikörper gekoppelt mit einer alkalischen Phosphatase, inkubiert. Nach 1h bei RT erfolgt der gewohnte Waschgang jedoch für je 15min. Anschließend werden die Folien zur Äquilibration kurz in 1xCDS, pH 9,5 gewaschen. Pro große Folie sollen 20ml Entwicklungslösung vorbereitet werden. Die Substratreaktion wird für 2-3h bei 37°C auf einem Schüttler im Dunklen durchgeführt. Von Zeit zu Zeit sollte die Entwicklung beobachtet und bei entsprechender Färbung gestoppt werden. Die Folien werden schließlich mit Leitungswasser gewaschen. Nun erfolgt die Auswertung mit den Platten, die in der Zwischenzeit bei 4°C gelagert wurden. Hierfür sind die drei Markierungspunkte wichtig, da sonst positive Phagenklone, die sich auf der Folie als dunkel-lila Punkte auszeichnen, nicht zugeordnet werden könnten. Gibt es positive Klone werden die zugehörigen Plaques aus der Platte mit einer Pipettenspitze ausgeschnitten. Dabei sollten auch einige umliegende Plaques mit ausgeschnitten werden. Positive Klone sind hier Phagen, die eine inserierte cDNA enthalten, gegen das Antikörper des Serums reagiert haben. Die Plaques werden schließlich in 500µl SM-Puffer aufgenommen und für ca. 1h bei 37°C geschüttelt. Anschließend werden die Agarstücke bei 10 000rpm für 4 min abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach der gleichen Prozedur wie oben bereits beschrieben, wird eine Bestätigung durchgeführt. Jedoch werden kleine Platten verwendet und die Plaquedichte sollte nicht zu hoch sein, so dass später das Isolieren eines einzelnen Plaques möglich sein sollte. Für die Bestätigung eines positiven Klones kommt nun das polyklonale Ausschneiden (gleichzeitige Mitnahme von umliegenden Plaques) zugute. Nach der Entwicklung sind nämlich bei einem positiven Klon nicht alle Plaques auf der Folie dunkel-lila gefärbt, sondern nur einige, so dass einfach zu erkennen ist, welcher der Plaques

ein positiver Klon ist und welcher ein negativer Klon ist. Lassen sich Klone bestätigen, werden dieses Mal die Plaques einzeln gepickt und in SM-Puffer aufgenommen. Zur Analyse der enthaltenen cDNA, werden sie in der In vivo Excision herausgeschnitten.

### **3) Ausschneiden der cDNA (*In vivo excision*)**

Zunächst werden Kulturen von MRF und von SOLR mit einer  $OD_{600} = 1.0$  in LB komplett ( $Mg^{2+}$  und Maltose) aus ÜN-Kulturen hergestellt. Erreichen die Bakterienkulturen die gewünschte Dichte, werden sie abzentrifugiert bei  $3500 \times g$  für 15min und schließlich in 10mM  $MgSO_4$  aufgenommen. Die SOLR-Kultur wird bis zur Verwendung bei  $4^\circ C$  aufbewahrt. Allerdings sollten beide Kulturen immer frisch angesetzt und nicht länger als 1 Woche aufbewahrt werden. Zunächst werden pro Klon 200 $\mu$ l MRF mit 250 $\mu$ l Phagenlösung und 1 $\mu$ l Helferphage (ExAssist® Helper Phage) zusammenpipettiert, für 15min bei  $37^\circ C$  inkubiert und später mit 3ml LB-Medium versetzt und für weitere 2-3h bei  $37^\circ C$  geschüttelt. In dieser Zeit führt der Helferphage einen Nick-Bruch an einem der beiden Stränge am fl Origin des pBluescript-Phagemids durch, so dass an der Stelle eine neue DNA Synthese aller 3' liegenden Sequenzen und so auch der inserierten cDNA beginnt. Die Synthese wird beendet bis ein Stopp-Signal erreicht wird. Ein zweites Genprodukt des Helferphagen zirkularisiert den ausgeschnittenen einzelsträngigen Phagemid.

Anschließend wird die Transfektionsansatz für 20min auf  $64-70^\circ C$  erhitzt und für 15min bei  $1000 \times g$  abzentrifugiert. Der Überstand wird schließlich in ein 15ml-Falconröhrchen überführt, mit 200 $\mu$ l SOLR versetzt, für 15min bei  $37^\circ C$  inkubiert und auf Ampicillin-LB-Platten ausplattiert. Aufgrund der eingebauten Ampicillin-Resistenz im pBluescript-Phagemid können nur rekombinante Bakterien wachsen. Die Platten werden schließlich ÜN in einen  $37^\circ C$  Brutschrank gelegt. Am nächsten Tag werden 4 einzelne Klone gepickt und in LB-Ampicillin-Medium ÜN bei  $37^\circ C$  hochgezogen. Am darauf folgenden Tag wird aus diesen Kulturen die Plasmid-DNA mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* isoliert.

Um die Monoklonalität zu testen wird eine Spaltung durchgeführt. Für den pBluescript werden die Restriktionsenzyme SmaI und KpnI verwendet.

#### **Spaltungsansatz:**

0,25 $\mu$ l Sma I (10U/ $\mu$ l)  
0,2 $\mu$ l Kpn I (10U/ $\mu$ l)  
1,3 $\mu$ l Spaltungspuffer OPA  
ad 10 $\mu$ l mit ddH<sub>2</sub>O

Der Spaltungsansatz (3 $\mu$ l DNA plus 10 $\mu$ l Spaltungsmix) wird für 1 h bei  $37^\circ C$  inkubiert und schließlich auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Nach dem Lauf wird das Gel in einem

Ethidiumbromidbad inkubiert und schließlich im UV-Licht auf Monoklonalität untersucht. Ist ein positiver Klon monoklonal gepickt worden, kann nun mit einer der 4 Parallel-Proben fortgefahren werden. Zur weiteren Analyse wird zunächst die Bakterien-Konzentration photometrisch bestimmt.

Für das Ansequenzieren des inserierten cDNA-Stücks wird eine Sequenzier-PCR mit dem T3 oder T7 Primer durchgeführt.

### ***HUSAR-Programme “TmHMM” und “Psort”***

Nach einer Datenbank-Analyse mit den identifizierten cDNA Sequenzen wurden die unbekannten Proteine, über die in der Literatur keine Informationen über ihre subzelluläre Lokalisation zu finden ist, mit den HUSAR-Programmen „TmHMM“ und „Psort“ analysiert.

Das Programm “TmHMM” ist ein Algorithmus, der unter Verwendung des Markov Modells Transmembrandomänen vorhersieht. Er wurde von Erik L.L. Sonnhammer, Gunnar von Heijne and Anders Krogh entwickelt (Sonnhammer et al., 1998).

Das Programm “Psort” schätzt subzelluläre Lokalisierungen ein, in dem das Programm nach bekannten Protein-Lokalisierungssignalen sucht. Das Originalprogramm wurde von Kenta Naka geschrieben (Humanes Genomzentrum, Institut für medizinische Wissenschaft, Universität Tokyo, Japan).

## **2.9. Sequenzierung von DNA**

### **Material**

#### ***Geräte***

*ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer*

*Applied Biosystems, Darmstadt*

#### ***Reagenzien***

*ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit*

*Applied Biosystems, Darmstadt*

Primer, diverse

### **Methode**

Die Sequenzierung erfolgte nach einer Modifizierung der Dideoxy- oder auch Kettenabbruch-Methode von F. Sanger. Die Analyse basiert auf dem Prinzip des Kettenabbruchs, der während der Komplementärstrang-Synthese entsteht, wenn anstatt eines Deoxynukleotids (dNTP) ein Dideoxynukleotid (ddNTP) eingebaut wird. Jedes der vier verwendeten ddNTPs

ist mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Daher tragen alle Fragmente denselben Farbstoff am Ende, deren Synthese durch den gleichen ddNTPs gestoppt wurde. Nach Ablösen der Fragmente vom Matrizenstrang, kann nun durch Messung der unterschiedlichen Fluoreszenz-Farben die Sequenz des synthetisierten, komplementären Strangs und somit auch die Sequenz des Matrizenstrangs ermittelt werden, da sich die Fragmente nur um jeweils ein Nukleotid unterscheiden.

**Sequenzier-PCR Ansatz:**

Big Dye                      2 oder 4µl (enthält Taq DNA-Polymerase, dNTP-Mix und ddNTP-Mix)  
Plasmid                      200-500ng  
Primer (T3 oder T7)    1µl  
ad 20µl mit H<sub>2</sub>O (Braun)

Das PCR-Programm:

96°C 16sec  
50°C 15sec  
60°C 4min  
mit 25 Zyklen

Das PCR-Produkt wird zunächst gefällt. Dafür werden 2µl 3M Natriumacetat und 50µl absolutes Ethanol zugegeben, kurz gevortext und für 10min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 13 000rpm für 15-20min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 250µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13 000rpm für 10 min wird das Pellet bei RT für 1-2h getrocknet. Anschließend werden 20µl Formamid hinzupipettiert, kurz gevortext, in ein Sequenzierröhrchen überführt und schließlich für 2min bei 96°C denaturiert. Die Proben werden dann sofort auf Eis gestellt und bis zur Sequenzierung bei 4°C aufbewahrt.

## **2.10. Isolierung von „Lipid rafts“ (Detergenz-resistente Membrandomänen)**

### **Material**

**Geräte:**

Dewar-Stickstoffbehälter	<i>KGW Isotherm</i> , Karlsruhe
Schwingmühle MM301	<i>Retsch</i> , Haan
Mahlbecher aus Teflon	<i>Retsch</i> , Haan oder institutseigene Werkstatt
Mahlkugeln aus Wolfram später aus Stahl	<i>Retsch</i> , Haan bzw. Neolab, Heidelberg
Dounce Homogenisator	<i>Wheaton Science products</i> , Millville NJ, USA
SW41 Rotor oder auch SW40.1 Rotor	<i>Beckman Rotors</i> , Kalifornien, USA



Protease-Inhibitor *Complete Mini*,  
EDTA-frei

*Roche Diagnostics*, Penzberg

***Puffer:***

TKM-Puffer:

50mM Tris-HCl, pH 7,4

25mM KCl

5mM MgCl<sub>2</sub>

1mM EGTA

und 1 Proteinase-Inhibitortablette (bei einem Volumen von 50ml)

TKM-Puffer mit 73% Sukrose

TKM-Puffer mit 30% Sukrose

TKM-Puffer mit 40% Sukrose

TKM-Puffer mit 5% Sukrose

## **Methode**

Die Isolierung wurde nach einer modifizierten Form der Methode von Ilangumaran et al. durchgeführt (Ilangumaran et al., 1997). 3,5 bis 5 x 10<sup>8</sup> Zellen werden zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren und in der Schwingmühle für 1min bei 3000rpm pulverisiert. Im Dounce Homogenisator wird schließlich das Zellpulver mit 2ml 73% Sukrose-TKM-Puffer versetzt und mit 10 bis 12 Hüben homogenisiert. Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1% wird dem Homogenisat zugegeben. Es folgt eine Inkubation für 20min auf Eis. Mit 73%igem Sukrose-TKM-Puffer und TKM-Puffer wird eine Konzentration von 40% Sukrose eingestellt. Das Homogenisat wird auf zwei SW40.1 Zentrifugenröhrchen verteilt und zunächst mit 6ml 30% Sukrose-TKM-Puffer und schließlich mit 3ml 5% Sukrose-TKM-Puffer überschichtet. Die Gradienten werden 18-20h bei 38.000rpm (250.000 x g) und 4°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden nun 1ml-Fraktionen vorsichtig von oben abgenommen und entweder ein Aliquot sofort zur Analyse auf ein SDS-PAGE-Gel geladen oder mit flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20°C gelagert.

Der übrige Teil der Fraktionen 3, 4 und 5 des Sukrose-Gradienten, die mit „Lipid rafts“ angereichert sind, werden vereinigt und mit 73 %igem Sukrose-TKM-Puffer auf 50% Sukrose erhöht. Anschließend werden 2ml des Gemischs erneut in ein SW40.1 Zentrifugenröhrchen überführt, zunächst mit 6ml 40%igem Sukrose-TKM-Puffer und schließlich mit 3ml 5%igem Sukrose-TKM-Puffer überschichtet. Nach einer zweiten Zentrifugation bei 38.000rpm (250.000 x g) und 4°C für 18h werden wieder 1ml-Fraktionen vorsichtig von oben abgenommen und Aliquots auf ein SDS-PAGE-Gel geladen. Zur späteren Untersuchung kann das Material auch wieder in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20°C gelagert werden.

## 2.11. RNA Isolierung und reverse Transkription

### Material

#### **Geräte:**

*Peltier Thermal cycler* (PTC 200) *Biozym Diagnostik GmbH*, Hess. Oldendorf

#### **Verbrauchsmaterial:**

Eppendorfröhrchen 1,5ml, 0,5ml, 2ml diverse Firmen

#### **Substanzen und Enzyme:**

<i>RNeasy Mini oder Midi Kit</i>	<i>Qiagen GmbH</i> , Hilden
<i>peqGOLD TriFast</i>	<i>Peqlab Biotechnologie GmbH</i> , Erlangen
DNase I, RNase-frei	<i>Roche Diagnostics GmbH</i> , Mannheim
RNase-free DNase Set	<i>Qiagen GmbH</i> , Hilden
Phenol/Chlorophorm	<i>Carl Roth GmbH+Co</i> , Karlsruhe
<i>iScript cDNA Synthesis Kit</i>	<i>Bio-Rad Laboratories</i> , Hercules, CA, USA

#### **Puffer:**

RNA-Ladepuffer:

50%	Glycerin
1mM	EDTA
0,4%	Bromphenolblau
4‰	Ethidiumbromid

RNA-Gellaufpuffer:

2,5 ml	Formamid
1ml	37% Formaldehyd
0,5ml	10x MOPS
1ml	DMPC H <sub>2</sub> O

10xMOPS:

400mM	MOPS (3-(N-Morpholino)propane sulfonic acid)
100mM	Natriumacetat
10mM	EDTA, pH 8

→ pH 7,0, autoklavieren und lichtgeschützt aufbewahren

DNase-Testpuffer:

25mM	Tris-HCl, pH 7,6
50%	Glycerin

→ autoklavieren

DMPC Wasser:

H<sub>2</sub>O mit 0,1% Dimethylpyrocarbonat (DMPC) versetzen, ca. 30min bei RT inkubieren, anschließend DMPC durch Autoklavieren inaktivieren

## Methode

Aus Zellen von Zelllinien oder Gewebe wird die Gesamt-RNA mittels des *RNeasy Kit* von Qiagen oder mit peqGOLD TriFast isoliert. Beide Isolierungen sind nach den Protokollen der Firmen durchgeführt worden. Die Isolierung mit peqGOLD TriFast erfordert allerdings eine nachfolgende DNase-Behandlung. Dafür wird die RNA-Probe auf 88µl mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die DNase wird 1:10 mit DNase-Puffer verdünnt und 2µl dieser Verdünnung der RNA-Probe zugegeben. Zusätzlich werden auch 10µl des DNase-Testpuffers hinzupipettiert und die RNA-Probe für 10min bei 25°C inkubiert. Um DNA zu entfernen, wird anschließend eine Phenol/Chlorophorm Extraktion durchgeführt. Dafür wird die RNA-Probe mit einem Volumenteil Phenol/Chlorophorm versetzt, kräftig geschüttelt und für 5min bei 13.000rpm zentrifugiert. Die entstandene, obere wässrige Phase wird vorsichtig abgenommen und schließlich gefällt mit Ethanol um die RNA-Probe wieder in ein kleineres Volumen zu bringen. Dafür wird die Probe mit zwei Volumenteilen 96%iges Ethanol und 1/10 Volumenteil 3M Natriumacetat versetzt und für 60min bei -80°C inkubiert. Anschließend folgt eine Zentrifugation für 30min bei 13 000rpm bei 4°C. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet mit 70%igem Ethanol für 5min gewaschen. Nach einer weiteren 10minütigen Zentrifugation bei 13.000rpm sollte nun vorsichtig das Ethanol abgezogen und das Pellet für kurze Zeit getrocknet werden. Anschließend wird das Pellet in RNase-freiem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

Zur Qualitätskontrolle wird ein RNA-Gel hergestellt. Dazu werden 1-2 µg RNA mit 2 Volumenteilen RNA-Probenpuffer gemischt und 10 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wird die Probe mit 2µl RNA Lade-Puffer in einem 1% Agarose 1x MOPS Gel bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Erscheinen im Gel die beiden signifikanten Banden der 28S und 18S rRNA, kann davon ausgegangen werden, dass die RNA nicht degradiert ist und sie in einer ausreichenden Menge vorhanden ist.

Mit dem iScript cDNA synthesis Kit von Bio-Rad wird nun mRNA in cDNA umzuschreiben. Die mRNA wird von der reversen Transkriptase, eine MMLV-abgeleitete reverse Transkriptase mit RNase H-Aktivität, abgelesen und in DNA umgeschrieben. Da hier keine DNA-abhängige Polymerase vorhanden ist, wird nur einzelsträngige copy-DNA (cDNA) polymerisiert. Der RNase-Inhibitor sorgt dafür, dass die RNA nicht degradiert wird. Man nutzt Oligo (dT) und random Hexamer-Primer, die sich an den Poly (A)-Schwanz oder zufällig nach einer statistischen Häufigkeit an die RNA anlagern. Dazu heizt man den Mix 10 min lang auf 25°C auf (Anlagerungsschritt der Primer). Während der 30 min bei 42°C

polymerisiert die RT von dem Primer aus in 5' Richtung. Die RT wird durch 5 min Inkubation bei 99°C inaktiviert. Die hergestellten cDNAs können schließlich bei -80°C gelagert werden. Ihre Qualität wird mittels einer PCR an dem Haushalts-Gen GAPDH (Glycerin-aldehyd 3-phosphat-Dehydrogenase) geprüft.

## 2.12. Klassische PCR

### Material

#### **Gerät:**

*Peltier Thermal cycler* (PTC 200)

*Biozym Diagnostik GmbH*, Hess.  
Oldendorf

#### **Substanzen und Puffer:**

*peqGOLD dNTP-Mix ,Long Range'* (40µM)  
Biotherm Taq Polymerase (5U/µl)  
10x Biotherm Puffer  
100% DMSO  
Aqua ad iniectabilia Braun

*Peqlab Biotechnologie GmbH*, Erlangen  
*NatuTec GmbH*, Frankfurt a/M  
*NatuTec GmbH*, Frankfurt a/M  
*Merck Biosciences*, Darmstadt  
*B. Braun Melsungen AG*, Melsungen

Primer (25µM)  
GAPDH forward  
GAPDH reverse  
DNA-Leiter, 1kb  
Agarose

hausintern hergestellt (Abt. V280)  
gtt tac atg ttc caa tat gat tcc ac  
tca tat ttg gca ggt ttt tct aga c  
*GeneCraft*, Lüdinghausen  
*Sigma-Aldrich Chemie GmbH*, Steinheim

#### **Puffer:**

50xTAE-Puffer (Gellauf):  
40mM Tris-HCl  
10mM Natriumacetat  
1mM EDTA, pH 7,8

#### **DNA-Loading Buffer:**

100mM EDTA, pH 8,0  
0,1% Bromphenolblau  
1% SDS  
50% Glycerin

### Methode

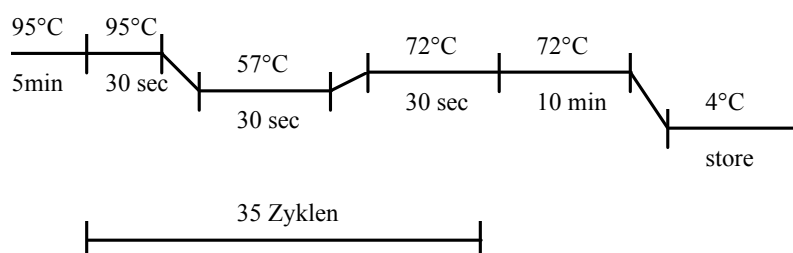
Dieser Ansatz gilt auch als allgemeiner PCR-Ansatz, der während der Arbeit verwendet worden ist, allerdings variiert die Annealingtemperatur und die Zyklenzahl. Die PCR-Produkte werden mit DNA Loadingbuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel mit TAE-

Puffer aufgetragen und zur Visualisierung für einige Minuten in ein Ethidiumbromid-Bad gelegt. Im UV-Licht können schließlich die Banden mittels der ebenfalls aufgetragenen DNA-Leiter untersucht werden.

#### PCR-Ansatz:

Biotherm Puffer	2,5µl	(1x)
DMSO	2,5µl	(10%)
Taq polymerase	0,5µl	(2,5U)
dNTP-Mix	0,5µl	(0,8µM)
Reverse Primer	1µl	(1µM)
Forward Primer	1µl	(1µM)
Template	1µl	(sollte ungefähr 10ng betragen)
ad H <sub>2</sub> O	25µl	

PCR-Programm (z.B. GAPDH mit einer Annealingtemperatur von 57°C und einem PCR-Produkt von 638bp):



## 2.13. Quantitative Real-time PCR

### Material

#### ***Geräte und andere Materialien:***

*iCycler iQ™ Real-Time PCR Detection System*

*ABgene Thermo-Fast 96, semi-skirted*

*Optical Tape*

*QIAquick Gel Extraction Kit*

*Bio-Rad Lab., München*

*ABgene House, Surrey, GB*

*Bio-Rad Lab., München*

*Qiagen GmbH, Hilden*

#### ***Software für die Auswertung der Messungen:***

*Optical System Software, Version 1.0*

*Bio-Rad Lab., München*

#### ***Reagenzien:***

*ABolute™ QPCR SYBR® Green Mix*

*ABgene House, Surrey, GB*

**Primer** (hergestellt in der Abteilung V280)

Transkript (Länge)	Forward/reverse	Sequenz (5'-3') mit Bindestelle
MT5-MMP (4312bp)	for	3647 - att agc tca cac ctg tcc act c - 3668
	rev	3752- gca agt aac aac ctc tct gtg c -3731
Integrin $\alpha$ (3567bp)	for	3141- ggg aaa atg gaa agt gga aaa g -3162
	rev	3282- caa tta ctc ttg gat ttg gc -3263
hZimp10 (7041bp)	for	3805- acc acc cac cac aga aaa gc -3823
	rev	3960- acc ccc tct caa aca cag ac -3941
FOX M1 (2544bp)	for	1697- caa aag tag cag tca cac cc -1716
	rev	1802- ctt tgt tgt tcc cac cct tc -1783
HMBS (1526bp)	for	170- ggc aat gcg gct gca a -185-
	rev	283- ggg tac cca cgc gaa tca c -215

**Methode**

Im hier verwendeten Real-time Detektionssystem wird die PCR-Produktzunahme durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I bei 520nm gemessen. Da es sich hier allerdings um einen Fluorophor handelt, der unspezifisch in Doppelstrang-DNA interkaliert, ist es von großer Wichtigkeit, dass Primerdimere ausgeschlossen werden können. Die Analyse auf eventuelle Primerdimer-Bildung erfolgt mit Hilfe einer Schmelzkurve. Primerdimere weisen dabei einen niedrigeren Schmelzpunkt auf als die größeren PCR-Produkte. Die daraus abgeleitete Darstellung der Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenz-Veränderung ergibt einen Kurvenverlauf, in dem das spezifische PCR-Produkt von den Primerdimeren unterscheidbar wird. Außerdem werden die Primer mittels Ansequenzieren des PCR-Produktes auf ihre Spezifität geprüft (siehe Material und Methoden, Kapitel 2.9.).

Um eine Quantifizierung der unbekannten Proben vorzunehmen, werden Standardreihen mit bekannter Kopienzahl verwendet. Dafür wird eine klassische PCR durchgeführt und das PCR-Produkt mit einem Agarosegel aufgetrennt. Die spezifische Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und das PCR-Produkt mit dem Gelextraktion-Kit aufgereinigt (siehe Anleitung

des Kits). Anhand der photometrisch ermittelten DNA-Konzentration wurde schließlich die Molekülzahl errechnet:

$$C_S = \frac{C_w}{N \times M_N} \times N_A$$

$C_S$ : Konzentration der Zielmoleküle ( $\mu\text{l}^{-1}$ )

$C_w$ : Konzentration (ng/ $\mu\text{l}$ )

$N_A$ : Avogadrozahl  $6,23 \times 10^{23} \times 10^{-9}/\text{nmol}$

$N$ : Anzahl der Nukleotide

$M_N$ : Molgewicht eines Basenpaars  $\rightarrow 649,5\text{ng}/\text{nmol}$

Die Messung der PCR-Produktmengen beruht darauf, ein Fluoreszenzschwellenwert zu berechnen (Threshold), der sich aus der Schwankungsbreite der Basisfluoreszenz während der ersten PCR-Zyklen (keine PCR-Produktbildung) errechnet. Aus den Threshold-Zyklen der Standardproben wird schließlich eine Kurve erstellt. Da die Molekülzahl in den Standardproben bekannt ist, kann mit dieser Kurve auch die Molekülzahl in den unbekannten Proben ermittelt werden.

Proben mit definierter Konzentration an Kopien als Standardproben:

MT5-MMP:  $9,6 \times 10^3$ ;  $9,6 \times 10^4$ ;  $9,6 \times 10^5$ ;  $9,6 \times 10^6$ ;  $9,6 \times 10^7$

ITGA4:  $2,5 \times 10^2$ ;  $2,5 \times 10^3$ ;  $2,5 \times 10^4$ ;  $2,5 \times 10^5$ ;  $2,5 \times 10^6$

hZimp10:  $2,2 \times 10^4$ ;  $2,2 \times 10^5$ ;  $2,2 \times 10^6$ ;  $2,2 \times 10^7$ ;  $2,2 \times 10^8$  bzw.  
 $5,5 \times 10^3$ ;  $1,1 \times 10^4$ ;  $2,2 \times 10^4$ ;  $2,2 \times 10^5$ ;  $2,2 \times 10^6$  in der zweiten Messung

FoxM1:  $8,7 \times 10^3$ ;  $8,7 \times 10^4$ ;  $8,7 \times 10^5$ ;  $8,7 \times 10^6$ ;  $8,7 \times 10^7$  bzw.  
 $8,7 \times 10^1$ ;  $8,7 \times 10^2$ ;  $8,7 \times 10^3$ ;  $8,7 \times 10^4$ ;  $8,7 \times 10^5$  in der zweiten Messung

HMBS:  $6 \times 10^3$ ;  $6 \times 10^4$ ;  $6 \times 10^5$ ;  $6 \times 10^6$ ;  $6 \times 10^7$

Zusätzlich ist es notwendig, dass die Transkriptmenge eines sogenannten Haushaltsgens ermittelt wird, von dem man ausgeht, dass es in allen Proben in konstanter Zahl pro Zelle vorliegt. In diesem Fall ist das niedrig exprimierte Enzym Hydroxymethyl-Bilane Synthase (HMBS) ausgesucht worden. Mit Hilfe der ermittelten HMBS cDNA-Menge können die einzelnen cDNA-Proben miteinander verglichen und so auch die ermittelten Transkriptmengen in entsprechender Relation zueinander gesetzt werden.

Insgesamt wurden von allen cDNA Proben zweimal Dreifachmessungen durchgeführt.

#### **Real-time PCR Ansatz:**

SYBR Green Mix (2x)	25 $\mu\text{l}$	
Template (cDNA)	1 $\mu\text{l}$	<500ng
Primer forward	1 $\mu\text{l}$	70nmol

Primer reverse	1µl	70nmol
H <sub>2</sub> O	ad 50µl	

Das PCR-Programm:

Enzymaktivierung	95°C	15min	} 40 Zyklen
Denaturierung	95°C	30sec	
Annealing	s.u.	30sec	
Extension	72°C	60sec	
Schmelzkurve	95°C	1min	
	60°C	1min	
	60°C-95°C	10sec	
	in 0,5°C-Schritten steigend, 80 Zyklen		

Die Annealing-Temperatur betrug für:

MT5-MMP mit einem PCR-Produkt von 106bp	→ 66°C
Integrin α4 mit einem PCR-Produkt von 142bp	→ 59°C
FOXM1 mit einem PCR-Produkt von 106bp	→ 62°C
hZimp10 mit einem PCR-Produkt von 156bp	→ 60°C
HMBS mit einem PCR-Produkt von 75bp	→ 64°C

#### Errechnung der Werte:

Von jeweils beiden Dreifach-Messungen wurden die ermittelten Kopiezahlen der interessanten Gene durch die Kopiezahlen des HMBS dividiert und daraus die Standardabweichung errechnet.

## 2.14. Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts

### Material

#### **Lösungen:**

1xPBS	<i>Biochrom KG, Berlin</i>
Ficoll Typ 400	<i>Pharmacia, Freiburg</i>

#### **Geräte:**

<i>Sorvall RT7 Zentrifuge</i>	<i>Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold</i>
-------------------------------	---

Zur Isolierung von PBMC wurden Buffy-Coats von gesunden Spendern aus der Blutbank in Mannheim verwendet. Ein Buffy Coat ist die Zellschicht aus Leukozyten und Thrombozyten, die durch Zentrifugation bei 2.800rpm für 20min bei RT von Vollblut (meistens 500ml) entsteht (daher auch Leukoytenfilm genannt). Sie trennt dabei die Plasmaschicht im oberen



Bereich von den pelletierten Erythrozyten. Nach Abpipettieren des Buffy Coats erfolgt die Gewinnung von PBMC durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation über Ficoll-Trennlösung nach der Methode von (Boyum, 1976). Da die Dichte von Ficoll mit 1,077 g/ml identisch ist wie die von Lymphozyten und Monozyten, werden diese durch Zentrifugation in der Interphase angereichert und dort als weißer Ring sichtbar. 2 Teile PBS wurden mit 1 Teil Buffy coat gemischt. Damit wurden nun vorsichtig 15 ml Ficoll überschichtet und für 20 min bei 1.200rpm bei RT zentrifugiert. Die Zellen waren nun in mehrere Schichten aufgetrennt: von unten nach oben befanden sich die Erythrozyten, Ficoll, eine weiße dünne Schicht mit den PBMC und darüber die Granulozyten und Thrombozyten. Die PBMC-Schicht wurde mit der Pipette abgesaugt und in 50 ml PBS aufgenommen. Durch zweimaliges Zentrifugieren (10min, 1200rpm, RT) und Zugabe von 50ml PBS wurden die Zellen gewaschen. So konnten aus 500ml Vollblut  $5-9 \times 10^8$  PBMC gewonnen werden. Die PBMC wurden bis zur weiteren Verarbeitung als Pellet bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 2.15. Isolierung von CD4+ T-Zellen aus PBMC

### Material

MACS CD4 MicroBeads, human  
MACS MS Separation columns

*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach  
*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach

### *Puffer:*

1x PBS, autoklaviert  
0,5% BSA  
2mM EDTA  
→ pH7,2, bei  $4^{\circ}\text{C}$  lagern

Zellen: CD14 depletierte PBMCs,  $1 \times 10^7$  pro 20 $\mu\text{l}$  Microbeads und MS Säule

### Methode

Die Isolierung wurde nach dem Protokoll der Firma durchgeführt.

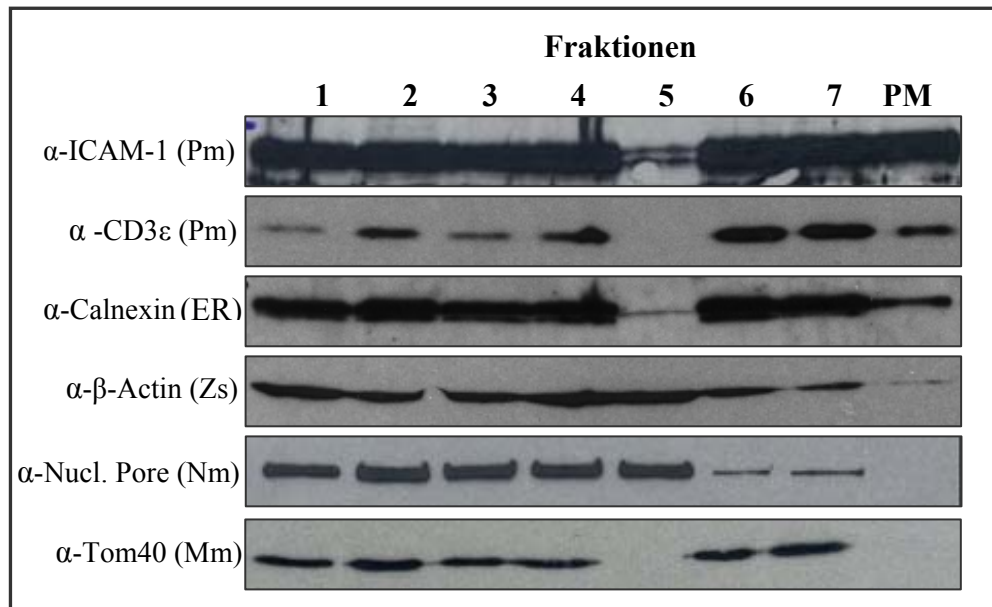
### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1. Über eine Plasmamembran-Anreicherung wurde ein Oberflächenpräparat der kutanen T-Zell Lymphomlinie HuT78 hergestellt, das als Antigengemisch dienen sollte

Für die Identifizierung von plasmamembranständigen Proteinen des kutanen T-Zell Lymphoms sollten zwei immunologische Methoden eingesetzt werden. Dafür war die Herstellung von Antiseren erforderlich, die gegen Oberflächen-Strukturen von CTCL-Zellen gerichtet sind. Um solche reaktiven Antiseren zu gewinnen, wurde zunächst als Antigengemisch ein mit Plasmamembran-angereichertes Präparat der CTCL-Zelllinie HuT78 hergestellt. Die Anreicherung erfolgte nach einer Methode von Ellis et al. (Ellis et al., 1992), die hier etwas modifiziert wurde. Die dafür eingesetzten HuT78-Zellen sind eine aus peripherem Blut eines Sézary Syndrom-Patienten etablierte Zelllinie.

Zunächst wurden ca.  $1 \times 10^9$  Zellen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, mit einer Schwingmühle pulverisiert und in einem Dounce Homogenisator homogenisiert. Das Homogenisat wurde schließlich nacheinander wie in Material und Methoden (s. Kapitel 2.2.) beschrieben mit differentiellen Zentrifugationsschritten von größeren Zellfragmenten und Kernen, von Mitochondrien, vom Endoplasmatischen Retikulum, von löslichen Proteinen und von anderen Bestandteilen unterschiedlicher Dichte aufgereinigt. Anders als die adhärenen Zelllinien, die in der publizierten Methode verarbeitet worden sind, fehlt der Suspensions-Zelllinie HuT78 die Unterteilung der Plasmamembran in eine apikale und basolaterale Seite. Daher wurde auf eine hierfür entwickelte diskontinuierliche Sukrose-Dichtegradientenzentrifugation (Ellis et al., 1992) verzichtet. In einem letzten Schritt wurde zur Gewinnung der Plasmamembran-Fraktion lediglich eine Zentrifugation auf ein 35% Sukrosekissen durchgeführt.

Um zu überprüfen, ob mit der gewählten Methode Plasmamembran angereichert wurde, wurden von einem Anreicherungsverfahren die einzelnen Fraktionen gesammelt und mit Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen organellspezifische Proteine untersucht (Abb. 3). Von allen Fraktionen wurden 20µg Gesamt-Protein auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nur in der Spur der mit Plasmamembran angereicherten Fraktion (PM) wurden lediglich 5µg Protein aufgetragen. In Spur 1 wurde das Ausgangsmaterial der Aufreinigung (die Zellsuspension) und in den Spuren 2 bis 7 Ausschlussfraktionen aufgetragen d.h. Fraktionen, die während der Aufreinigung verworfen wurden (s. Abbildung 2 in Material und Methoden, Kapitel 2.2.).



**Abbildung 3: Analyse der Plasmamembran-Anreicherung mittels Western Blot mit Antikörpern gegen organellspezifische Proteine.** Von den Proben 1-7 wurden 20µg und von Probe PM wurden 5µg Gesamt-Protein aufgetragen. Alle Analysen wurden mit demselben Blot durchgeführt. Für weitere Informationen siehe Text.

1: Zellsuspension nach Pulverisierung und Homogenisierung

2: Pellet nach Zentrifugation bei 270 x g

3: Pellet nach Zentrifugation bei 920 x g

4: Pellet nach Zentrifugation bei 2300 x g und Zugabe von  $MgCl_2$

5: Obere Phase nach Zentrifugation bei 100.000 x g

6: Pellet nach Zentrifugation bei 100.000 x g

7: Pellet nach Zentrifugation bei 68.000 x g mit einer 35%iger Saccharoselösung

PM: Pellet nach 2. Zentrifugation bei 100.000 x g (Interphase der 35%igen Saccharosenzentrifugation)

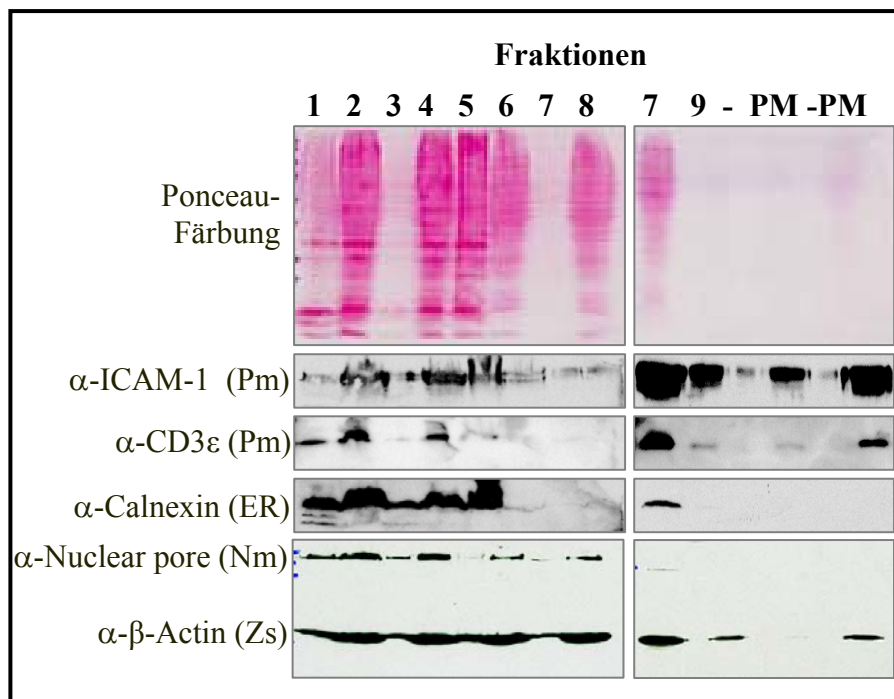
Abkürzungen: Pm: Plasmamembran; ER: Endoplasmatisches Retikulum, Zs: Zytoskelett; Nm: Nukleäre Membran; Mm: Mitochondrielle Membran

Als Markerproteine der Plasmamembran wurden Antikörper gegen das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) und gegen die  $\epsilon$ -Untereinheit des CD3-Komplexes verwendet. Calnexin wurde als Marker für das Endoplasmatische Retikulum und  $\beta$ -Actin als Marker für das Zytoskelett eingesetzt. Ein Epitop eines Kernporenproteins (nuclear pore), das von der Firma nicht näher beschrieben ist, wurde als Marker für die Kernmembran und Tom40 als Marker für die Mitochondrienmembran eingesetzt. In Abbildung 3 sind die Banden der Western Blot Analysen dargestellt, die mit den jeweiligen Antikörpern sichtbar wurden.

Das Ergebnis zeigt, dass in der Spur PM die Plasmamembran-Marker ICAM-1 und die  $\epsilon$ -Untereinheit des CD3-Komplexes in hoher Menge nachweisbar sind, wohingegen die Marker für andere Zellbestandteile wie das Endoplasmatische Retikulum, Zytoskelett, nukleäre oder mitochondrielle Membran reduziert oder nicht mehr sichtbar sind. Das kann vor allem durch

einen direkten Vergleich des Ausgangsmaterials (Spur 1) mit der Plasmamembran angereicherten Fraktion (Spur PM) verdeutlicht werden.

Die in der unteren Abbildung 4 dargestellte Western Blot Analyse bestätigt das Ergebnis, in der die Aufreinigungs-Fractionen mit der Startmenge verglichen ihren Volumenanteilen entsprechend aufgetragen wurden. Beispielsweise resultierten die Spuren 3 und 4 aus Spur 2 (Überstand der 270 x g Zentrifugation). Spur 3 machte dabei als Pellet ein Volumenteil von 1/9 und Spur 4 als Überstand ein Volumenteil von 8/9 der Spur 2 aus. Dementsprechend wurden ihre Mengen auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.



**Abbildung 4: Western Blot Analyse der einzelnen PM-Anreicherungsfraktionen**, die hier zum Vergleich in entsprechenden Volumenteilen aufgetragen worden sind. Die Ponceau-Färbung stellt dabei das jeweilige Gesamt-Protein dar. Alle Analysen wurden an demselben Blot durchgeführt.

- 1: Pellet nach Zentrifugation bei 270 x g (1,4µl)
- 2: Überstand nach Zentrifugation bei 270 x g (12µl)
- 3: Pellet nach Zentrifugation bei 920 x g (1,7µl)
- 4: Überstand nach Zentrifugation bei 920 x g (12µl)
- 5: Pellet nach Zentrifugation bei 2300 x g (2,5µl)
- 6: Überstand nach Zentrifugation bei 2300 x g (12µl)
- 7: Pellet nach erster Zentrifugation bei 100.000 x g (1µl)
- 8: Überstand nach Zentrifugation bei 100.000 x g (12µl)
- 7: Pellet nach erster Zentrifugation bei 100.000 x g (15µl)
- 9: Pellet nach Saccharose-Zentrifugation bei 68.000 x g (4µl)
- PM: Pellet nach zweiter Zentrifugation bei 100.000 x g (4µl)
- PM: Pellet nach zweiter Zentrifugation bei 100.000 x g (17µl)

Abkürzungen: Pm: Plasmamembran; ER: Endoplasmatisches Retikulum, Zs: Zytoskelett; Nm: Nukleäre Membran; Mm: Mitochondrielle Membran

Zur Visualisierung der jeweiligen aufgetragenen Gesamt-Proteinmenge ist eine Ponceau-Färbung des Blots oben in Abbildung 4 dargestellt. Zusammengefasst, ist die Spur PM auch hier anscheinend durch geringe Mengen von Zytoskelett ( $\beta$ -Actin) und das Fehlen von Endoplasmatischem Retikulum (Calnexin) ausgezeichnet. Auch wenn hier die Gesamt-Proteinmenge (1. PM-Spur) im Vergleich zu den Spuren 2 und 4 sehr niedrig ist (s. Ponceau-Färbung), sind hier starke Signale für die Plasmamembran-Marker ICAM-1 und CD3 $\epsilon$  zu sehen. Auch die weitere PM-Spur (s. letzte Spur), bei der mehr Protein aufgetragen worden war, zeigt das gleiche Bild.

Die Menge an plasmamembranständigen Markern (ICAM-1 und CD3 $\epsilon$ ) scheint im Vergleich zu den Ausgangsfraktionen mehrfach angereichert. Wohingegen der nukleäre und auch der ER-Membranmarker (Nuclear pore und Calnexin) ausgedünnt ist. Somit wurde mit der verwendeten Methode anscheinend ein Plasmamembran angereichertes Präparat aus der kutanen T-Zell Lymphomlinie HuT78 gewonnen, das im weiteren Verlauf der Arbeit als Antigengemisch für die Immunisierung von Kaninchen verwendet werden konnte. Im folgenden wird es auch als HuT78-Oberflächenpräparat bezeichnet.

### 3.2. Generierung von Kaninchenseren gegen Proteine des HuT78-Oberflächenpräparats

Für die Immunisierung von Kaninchen wurde HuT78-Oberflächenpräparat als Antigengemisch verwendet. Um eine ausreichende Menge an Protein für die Immunisierung eines Kaninchens zu erhalten, wurden insgesamt 14 Anreicherungen durchgeführt und die erhaltenen Präparate vereinigt. Insgesamt war dafür eine Zellzahl von ca.  $1,5 \times 10^{10}$  erforderlich. Das vereinigte Oberflächenpräparat hatte photometrisch gemessen eine Konzentration von  $1,5\mu\text{g}/\mu\text{l}$  und ein Volumen von ca. 1,1ml, so dass die Gesamtproteinmenge 1,68mg betrug. Es wurde schließlich in 4 Aliquots aufgeteilt.

Die Immunisierung des ersten Kaninchens fand im hausinternen Tierstall des DKFZ statt. Das Kaninchen (Chinchilla bastard) wurde subkutan folgendermaßen immunisiert:

- 12.9.2003: 1. Injektion mit  $250\mu\text{l}$  ( $\sim 375\mu\text{g}$ ) Protein plus  $250\mu\text{l}$  komplettem Freundschens Adjuvans  
Zuvor aus ca. 10ml Gesamt-Blut 6ml Serum (Prä-Immunserum) gewonnen.
- 9.10.2003: 2. Injektion (1. Boost) mit  $250\mu\text{l}$  ( $\sim 375\mu\text{g}$ ) Protein plus  $250\mu\text{l}$  inkomplettem Freundschens Adjuvans  
Zuvor aus ca. 15ml Gesamt-Blut 7-8ml Serum (Antiserum 1) gewonnen.
- 23.10.2003 3. Injektion (2. Boost) mit  $250\mu\text{l}$  ( $\sim 375\mu\text{g}$ ) Protein plus  $250\mu\text{l}$  inkomplettem Freundschens Adjuvans  
Zuvor aus ca. 15ml Gesamt-Blut 7-8ml Serum (Antiserum 2) gewonnen.
- 6.11.2003 4. Injektion (3. Boost) mit  $365\mu\text{l}$  ( $\sim 450\mu\text{g}$ ) Protein plus  $250\mu\text{l}$  inkomplettem Freundschens Adjuvans  
Zuvor aus ca. 20ml Gesamt-Blut 6ml Serum (Antiserum 3) gewonnen.
- 20.11.2003 20ml Gesamtblut (10ml Serum) als Antiserum 4 entnommen.
- 28.11.2003 Entblutung → aus 120ml Gesamtblut 62ml Serum (Endserum) gewonnen.

Die Präparation für eine zweite Immunisierung wurde mit  $1,3 \times 10^{10}$  HuT78 Zellen durchgeführt. Die Protein-Konzentration der vereinigten Oberflächenpräparate betrug  $2\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in einem Volumen von  $700\mu\text{l}$ , so dass insgesamt  $1400\mu\text{g}$  Protein vorhanden waren. Das Präparat wurde dieses Mal in zwei Portionen mit je  $500\mu\text{g}$  und eine Portion mit  $400\mu\text{g}$  Protein aufgeteilt. Die Immunisierung wurde mit nur zwei Boostreaktionen durchgeführt und von der Firma Eurogentec in Belgien durchgeführt:

- 15.12.2003 1. Injektion mit  $250\mu\text{l}$  ( $\sim 500\mu\text{g}$ ) Protein plus  $250\mu\text{l}$  kompletten Freundschens Adjuvans

Zuvor 10ml Serum (Prä-Immunserum) gewonnen.

12.01.2004 2. Injektion (1. Boost) mit 250µl (~500µg) Protein plus 250µl inkomplettem Freundschens Adjuvans

Zuvor 2ml Serum (Antiserum 1) gewonnen.

26.01.2004 3. Injektion (2.Boost) mit 200µl (~400µg) Protein plus 250µl inkomplettem Freundschens Adjuvans

Zuvor 2ml Serum (Antiserum 2) gewonnen.

09.02.2004 10ml Serum (Antiserum 3) gewonnen.

19.02.2004 Ausblutung des Kaninchens → 50ml Serum (Endserum) gewonnen.

Die Seren wurden eingefroren zugeschickt. Der Test der Reaktivität erfolgte mit einem ELISA und dem Oberflächenpräparat als Antigen.

### 3.3. Die Kaninchenserum reagieren spezifisch mit Oberflächen-Proteinen von HuT78-Zellen

Nach Gewinnung beider Kaninchen-Antiseren wurde kontrolliert, ob eine Reaktivität gegen die Proteine des Oberflächenpräparats vorlag. Dafür wurde ein konventioneller ELISA durchgeführt. HuT78-Oberflächenpräparat diente dabei als Antigen und die während der Immunisierungen gewonnenen Antiseren (Prä-Immunserum, Antiserum 1-4 und Endserum) als Antikörperproben. Die Proteinmenge für die Analyse der Seren des ersten Kaninchens betrug 120µg, die auf 84 Löcher einer 96 Loch-ELISA-Platte verteilt und mit Coatingpuffer versetzt wurden, so dass letztlich in jedem Loch eine Proteinmenge von 1,4µg in einem Volumen von 100µl vorlag. Die eingesetzte Proteinmenge des Oberflächenpräparats für die Analyse der Seren des zweiten Kaninchens betrug pro Loch 1,3µg.

Am jeweiligen nächsten Tag wurden die Platten mit den verschiedenen Antiseren in unterschiedlicher Verdünnung pipettiert. Das Pipettierschema des ELISA für beide Antiseren-Serien war das gleiche (s. Material und Methoden, Kapitel 2.5., Tabelle 4). Beide Tests wurden mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Als Negativkontrolle diente in den jeweiligen letzten Reihen der Platte der Blockierungspuffer. Die Messung im ELISA-Reader bei  $E_{450nm}$  ergab folgendes Ergebnis für die einzelnen Antiseren der ersten Immunisierung:

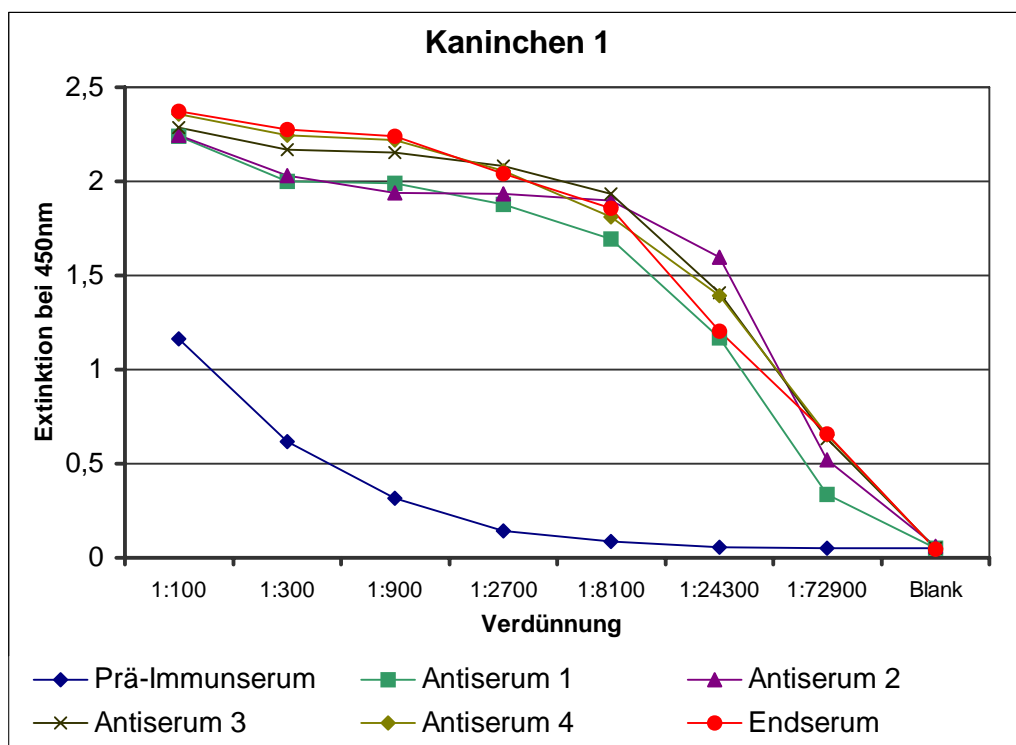
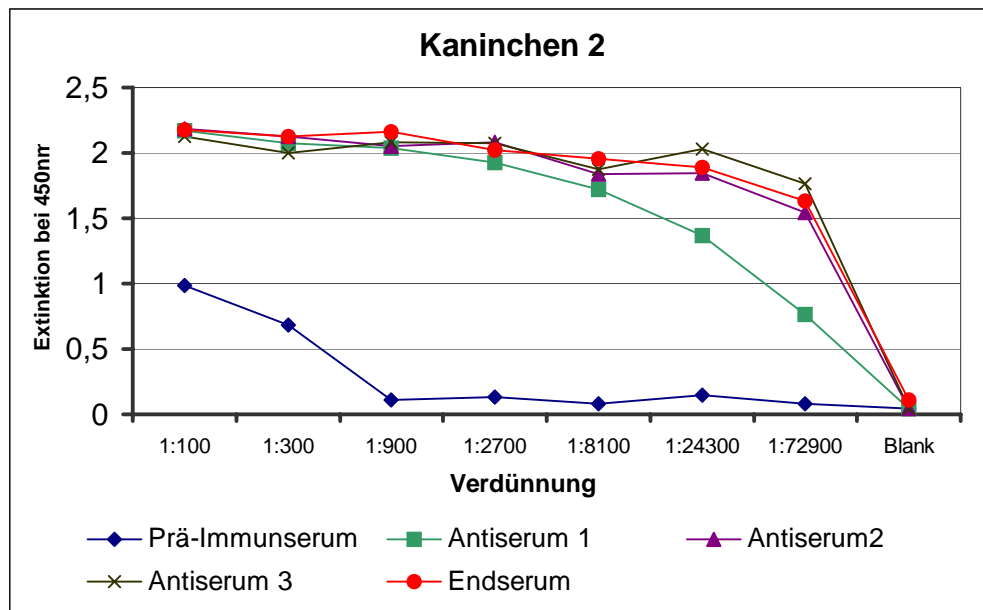


Abbildung 5: ELISA-Test der Antiseren von Kaninchen 1



Die Kurve des Prä-Immunserums liegt weit unter den übrigen Antiseren und kann daher als unspezifisch gewertet werden. Die Antiseren 1 bis 4 zeigen alle eine ähnliche Reaktivität. Diese Befund führte zu dem Entschluss, bei der zweiten Immunisierung eine Boostreaktion auszusparen.

Die Antiseren des zweiten immunisierten Kaninchens ergaben im ELISA-Test die in Abbildung 6 zusammengefassten  $E_{450nm}$ -Werte:



**Abbildung 6: ELISA-Test der Antiseren von Kaninchen 2**

Sie sind ähnlich wie die Ergebnisse der ersten Immunisierung in Abbildung 5. Die Kurve des Prä-Immunserums liegt wieder weit unter denen der Antiseren und pendelt sich schon bereits ab der Verdünnung von 1:900 bei Null ein. Die Reaktivität des Antiserums 1, das Antiserum nach der ersten 1. Injektion, fällt mit steigender Verdünnung als erstes ab. Die übrigen Antiseren haben ungefähr die gleichen Werte.

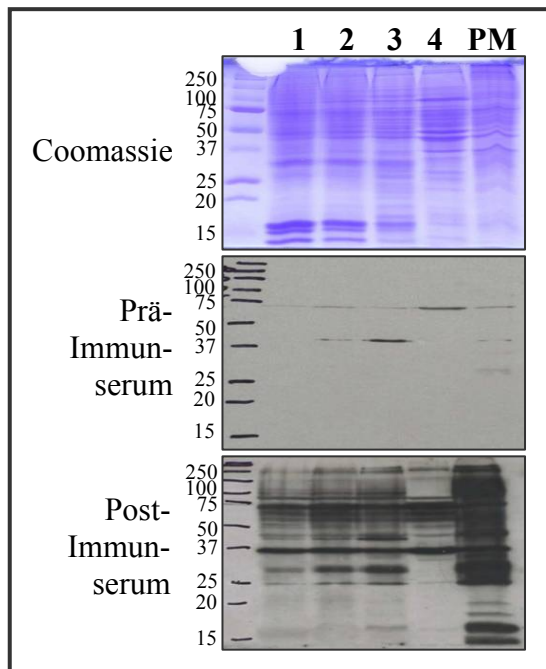
Die Auswertung der ELISA-Ergebnisse ergibt, dass die Antiseren reaktiv gegen das Antigen-gemisch, das HuT78-Oberflächenpräparat, sind, was als Basis für das weitere Vorgehen diente.

## **Die Kaninchenserum erkennen das HuT78-Oberflächenpräparat auch im denaturierten Zustand**

Nach der ELISA-Analyse wurde untersucht, ob die Kaninchenserum auch Proteine des HuT78-Oberflächenpräparats im denaturierten Zustand erkennen und welche Größen die Antigene aufweisen. Dafür wurden Western Blot Analysen durchgeführt, von denen hier exemplarisch die Analyse mit dem Endserum des ersten Kaninchens dargestellt ist. Zunächst wurden das Oberflächenpräparat und vier Ausschlussfraktionen, die in demselben Anreicherungsverfahren erhalten worden waren (siehe hierfür auch in Material und Methoden, Kapitel 2.2., Abbildung 2), in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach Transfer auf Nitrocellulosemembran wurde der erhaltene Blot zuerst mit 1:5000 verdünntem Prä-Immunserum inkubiert und später gestrippt um ihn mit dem Endserum (1:5000), dem Post-Immunserum, zu inkubieren. Parallel dazu wurden dieselben Fraktionen in gleicher Menge auf ein zweites Gel geladen. Dieses Gel wurde Coomassie gefärbt und sollte das Bandenmuster der einzelnen Fraktionen sichtbar machen.

Der Vergleich des Coomassie gefärbten Gels mit dem Western Blot des Post-Immunserums in Abbildung 7 zeigt, dass je nach Behandlung ein unterschiedliches Bandenmuster entsteht. Mit der Coomassie-Färbung sehen alle Spuren gleich stark angefärbt aus, was ein Auftrag von ähnlichen Proteinmengen bedeutet. Die ersten drei Spuren weisen ein gleiches Bandenmuster auf, wohingegen die Spur 4 und Spur PM abweichende Muster besitzen. Beim Western Blot mit dem Post-Immunserum sehen die ersten drei Spuren ebenfalls fast gleich aus. Das Muster mit den wenigsten Banden hat Spur 4, das den Überstand nach der ersten Zentrifugation bei 100.000 x g enthält und somit die löslichen Proteine des Zytosols darstellt. Die Proteine in der Spur des Oberflächenpräparats reagierten sehr stark mit den Antikörpern des Post-Immunserums, was den großen Unterschied in der Signalintensität von Coomassie und Western Blot ausmacht. Zusätzlich liefert das Muster der PM-Spur einen Eindruck über das breite Spektrum der Antikörper-Reaktivität des Antiserums. Interessanterweise sind hier zwei stark detektierte Banden bei etwa 15 kDa zu erkennen, die bei Coomassie-Färbung nicht erscheinen und die auch in den übrigen Spuren nicht so stark vertreten sind (siehe später auch nächstes Kapitel, Abbildung 12).

Auf dem Blot des Prä-Immunserums im mittleren Teil der Abbildung 7 sind lediglich zwei Banden auf der Höhe von ca. 70kDa und 40kDa zu erkennen. Der Vergleich mit dem Blot des Post-Immunserums (unterer Teil der Abbildung 7) macht deutlich, dass das Post-Immunserum tatsächlich spezifisch mit Proteinen des HuT78-Oberflächenpräparats reagiert.



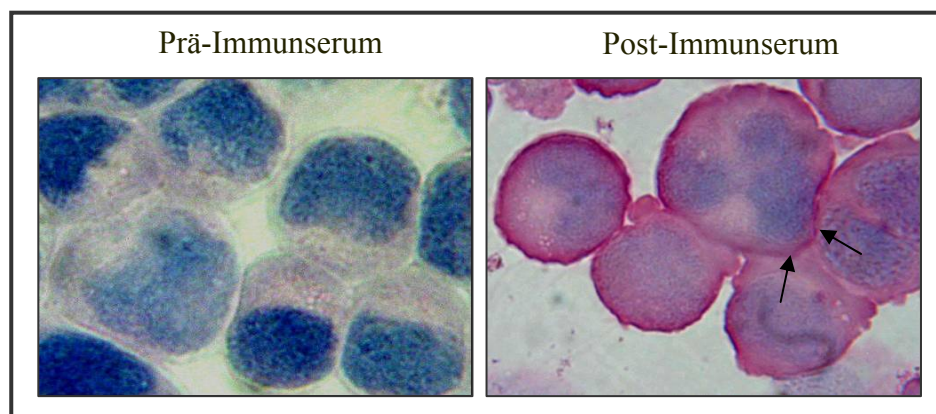
**Abbildung 7: Western Blot Analyse einiger PM-Anreicherungsfraktionen mit dem Prä- und Post-Immunserum.**

Von den Fraktionen wurden jeweils 15µg Gesamtprotein auf zwei SDS-Polyacrylamidgele aufgetragen. Das erste wurde Coomassie gefärbt, das zweite geblottet und nacheinander mit beiden Seren (1:5000) inkubiert. Mit dem Prä-Immunserum sind schwach bei etwas unter 75kDa in allen Fraktionen eine Bande und bei etwas über 37kDa in den Spuren 2,3 und PM eine Banden zu erkennen. Mit dem Post-Immunserum hingegen ist in allen Spuren ein breites Bandenmuster zu sehen. Zusätzlich ist Spur PM aber am stärksten erkannt worden.

- 1: Pellet nach Zentrifugation bei 270 x g
- 2: Pellet nach Zentrifugation bei 920 x g
- 3: Pellet nach Zentrifugation bei 2300 x g
- 4: Überstand nach Zentrifugation bei 100.000 x g
- PM: HuT78-Oberflächenpräparat

## Die Kaninchenseren erkennen HuT78 Zellen im nativen Zustand

Im Folgenden sollte geprüft werden, ob die Post-Immunseren intakte Zellen der T-Zelllinie HuT78 erkennen und welchem Zellort, die erkannten Antigene zuzuordnen sind. Dafür wurden Zytospins mit HuT78-Zellen hergestellt und mit den Seren 1:50 verdünnt inkubiert. Eine Hämalaun-Färbung der Zellkerne erleichterte dabei die Erkennung der Zellkerngrenzen. Die Analyse wurde mit den Seren des ersten Kaninchens durchgeführt.

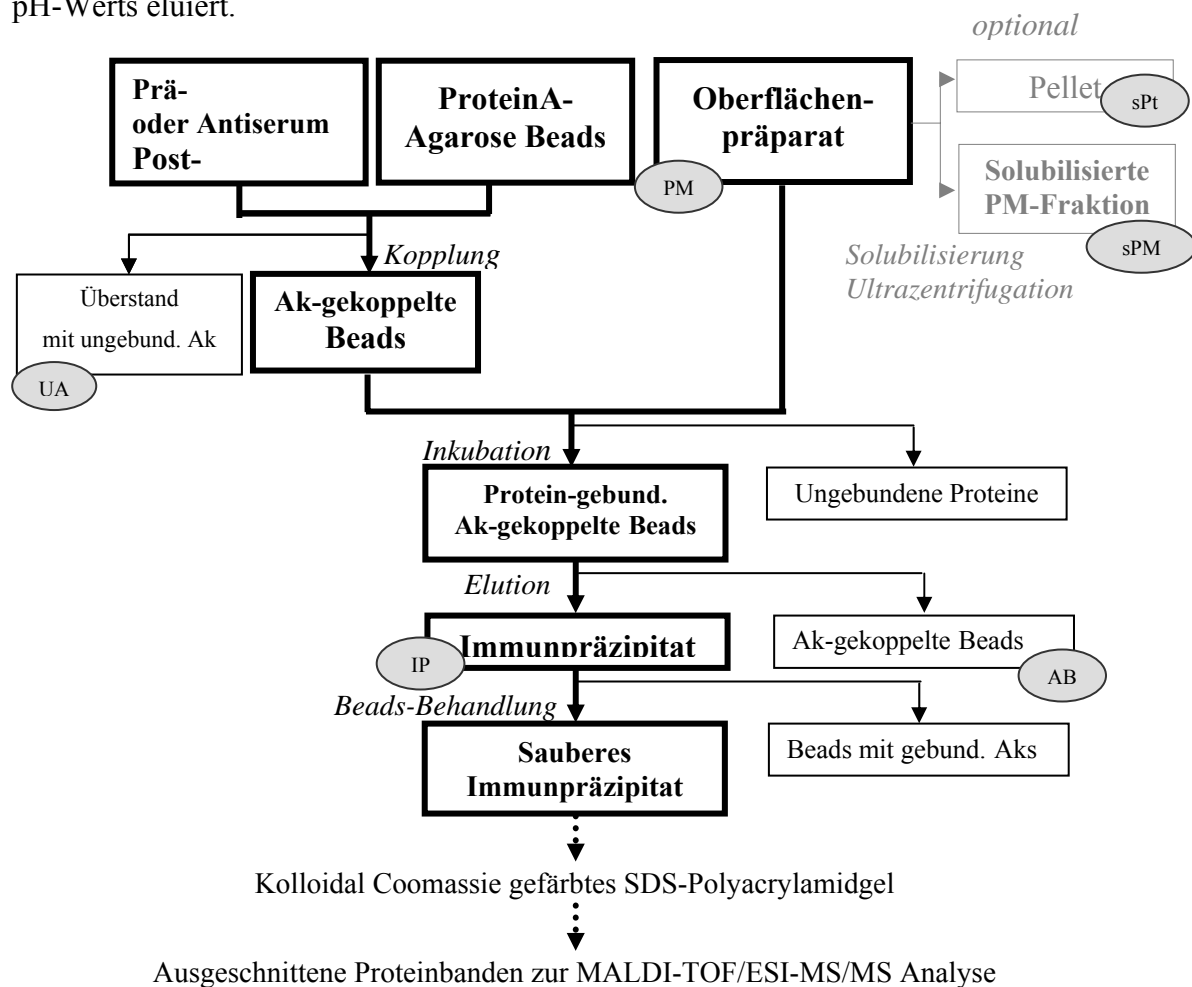


**Abbildung 8: Immunzytochemie von HuT78 Zellen mit den Kaninchenseren.** Die fixierten Zellen wurden mit dem Prä- bzw. Post-Immunserum mit einer Verdünnung von 1:50 behandelt. Die Zellen, die mit dem Prä-Immunserum inkubiert wurden, weisen kaum eine rote Färbung auf, wohingegen eine starke Anfärbung der Zellen mit dem Post-Immunserum zu erkennen ist. Die Pfeile weisen auf stark angefärbte Plasmamembran hin.

Die Ergebnisse in Abbildung 8 bestätigen erneut, dass das Post-Immunserum im Gegensatz zum Prä-Immunserum augenscheinlich Antikörper gegen HuT78-Proteine enthält. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse, dass die Antikörper Proteine erkennen, wie sie in intakten Zellen nativ vorliegen. Da die Zellränder auf der rechten Abbildung stark gefärbt sind (s. Pfeile), wird auch deutlich, dass besonders Proteine der Plasmamembran Zielstrukturen der Antikörper sind.

### 3.4. Proteine des Oberflächenpräparats, die von Kaninchen-Antikörpern immunpräzipitiert wurden: Identifizierung des Vorläuferproteins des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1

Nach Bestätigung der Reaktivität gegen das HuT78-Oberflächenpräparat konnten die Kaninchenserum für die Suche nach Plasmamembranproteinen verwendet werden. Als erste Möglichkeit zur Identifizierung wurden sie in einer Immunpräzipitation eingesetzt, deren Schema unten dargestellt ist (Abb. 9). Hierfür wurden Antikörper des Prä- bzw. des Post-Immunserums an Protein-A Agarose-Beads gekoppelt. Dabei binden 500µg Protein A-Agarose an 10 bis 20mg pure Antikörper, das ungefähr 2ml Serum entspricht. Die gekoppelten Antikörper wurden mit dem HuT78-Oberflächenpräparat ÜN bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden zunächst die ungebundenen Proteine entfernt und nach dreimaligem Waschen der Antikörper-gekoppelten Beads die präzipitierten Proteine durch Ansäuern des pH-Werts eluiert.



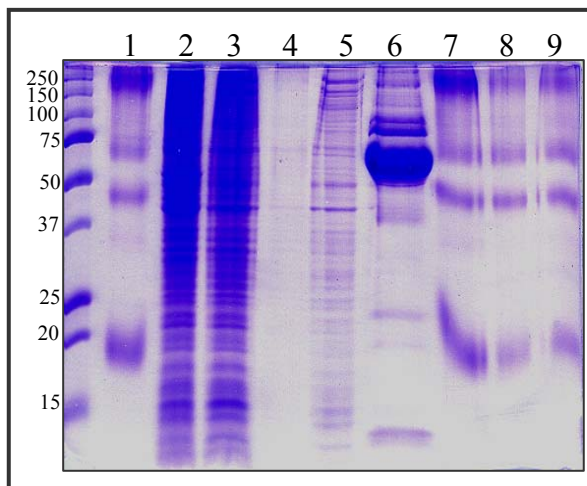
**Abbildung 9: Schema der Immunpräzipitation.** Die wichtigen Schritte der Vorgehensweise sind mit dickem Strich und die Ausschluss-Fraktionen mit dünnem Strich markiert.

PM: Oberflächenpräparat (Plasmamembran-Fraktion), sPM: solubilisierter Plasmamembran-Fraktion nach Ultrazentrifugation (Überstand), sPt: solubilisierter Pellet nach Ultrazentrifugation, UA: Überstand mit ungebundenen Antikörpern, IP: Immunpräzipitat, AB: Ak-gekoppelte Beads.

Die Immunpräzipitate wurden schließlich in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit kolloidalem Coomassie anfärbt. Zur Identifizierung der präzipitierten Proteine wurden Banden ausgeschnitten und mit massenspektrometrischen Analysen untersucht.

Um ein gutes und spezifisches Binden von Proteinen an die Antikörper-gekoppelten Beads zu erzielen, wurden zunächst mehrere Vorgehensweisen getestet. Als erstes sollte eine Test-Immunpräzipitation zeigen, ob eine vorgeschaltete Solubilisierung des Oberflächenpräparats mit dem nicht-ionischen Detergenz Tween-20 (Vereinzelung der Plasmamembranproteine in Detergenz-Mizellen) und eine anschließende Ultrazentrifugation notwendig ist. Abbildung 10 zeigt, dass das behandelte Präparat (Ultrazentrifugations-Überstand nach Solubilisierung, Spur 4) viele Proteine verloren hat. Das Pellet der Ultrazentrifugation (Spur 5) mit den nicht solubilisierten Proteinen weist hingegen noch viele Banden auf.

Wahrscheinlich hat die Behandlung mit Tween-20 allein nicht ausgereicht. Plasmamembranproteine benötigen nämlich sehr unterschiedliche Detergenzien, um aus der Membran freigesetzt zu werden. Allerdings könnte ein Gemisch aus mehreren nicht-ionischen Detergenzien sich negativ auf die nachfolgende Immunpräzipitation auswirken. Daher wurde keine Vereinzelung der Proteine mehr durchgeführt, sondern lediglich eine Homogenisierung im Dounce Homogenisator vorgenommen. Eine weitere Überlegung für dieses Vorgehen war, dass so auch assoziierte Proteine, die weniger immunogen sind, kopräzipitiert und ebenfalls identifiziert werden könnten.



**Abbildung 10: Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel mit Fraktionen der Test-Immunpräzipitation.** Von allen Proben wurden jeweils 15µl aufgetragen. Spur 6 wurde lediglich mit 1µl beladen.

- 1: Immunpräzipitat ohne Vorreinigung (IP)
- 2: Pellet nach Sukrosezentrif. der PM-Anreicherung
- 3: Oberflächenpräparat (PM)
- 4: UZ-Überstand nach Solubilisierung (sPM)
- 5: UZ-Pellet nach Solubilisierung (sPt)
- 6: Überstand nach Ak-Kopplung (UA)
- 7: Immunpräzipitat nach Vorreinigung
- 8: Beads nach Vorreinigung
- 9: Beads ohne Vorreinigung (AB)

Die Abkürzungen in Klammern entsprechen dabei denselben wie denen in der Abbildung 9.

Das Gel zeigt auch, dass ein Vorreinigen des Oberflächenpräparats mit ungekoppelten Protein-A-Agarose Beads, d.h. das Entfernen von Proteinen aus der Fraktion, die unspezifisch an Protein-A binden, nicht notwendig ist (in Abbildung 9 nicht berücksichtigt). Spur 7 und 8 zeigen das Immunpräzipitat und die Beads nach der Elution mit einem vorgeschalteten

Vorreinigen und Spur 1 und 9 zeigen das Immunpräzipitat und die Beads ohne ein Vorreinigen. Es ist kein Unterschied zu erkennen.

In allen vier Spuren sind drei markante Banden bei etwas unter 20kDa, bei etwas unter 50kDa und etwas unter 75kDa zu sehen. Die Bande bei 20kDa enthält die leichte Kette der Immunglobuline des Typs G (IgG) des Kaninchens, die Banden bei 50kDa die schwere Kette und die Bande bei 75kDa ganze IgG-Moleküle. In Spur 6 ist der Überstand mit den ungebundenen Serum-Proteinen nach Kopplung der Antikörper an die Beads zu sehen. Die markante Bande ist das 67kDa große Albumin. Auf der Höhe der leichten IgG-Ketten ist nur eine schwache Bande zu sehen, so dass man folgern kann, dass unter den gewählten Bedingungen das Koppeln der Antikörper an die Beads funktioniert.

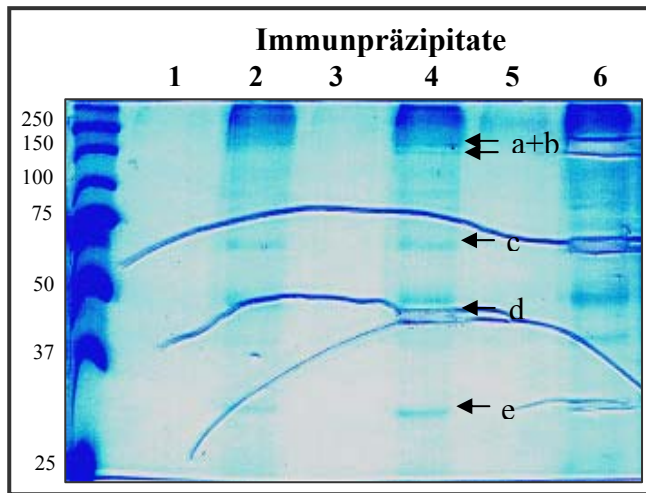
Aus den Vorläufen resultierend wurde nun die erste Immunpräzipitation durchgeführt, in der weder eine Solubilisierung noch eine Vorreinigung des Oberflächenpräparats stattfand. Die Antikörper der Kaninchenserum wurden mit den Beads gekoppelt und dem homogenisierten HuT78-Oberflächenpräparat zugegeben. Es wurden drei verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Antigenmengen aufgetragen:

**Tabelle 5: Eingesetzte Antikörper-Beads- und Antigenmengen der ersten Immunpräzipitation**

IP-Ansatz <sup>1</sup>	Eingesetzte Ak-gekoppelte Beads-Menge	Eingesetzte Proteinmenge des HuT78-Oberflächenpräparats
1 + 2	300µg	140µg
3 + 4	300µg	70µg
5 + 6	300µg	120µg

<sup>1</sup>Ziffern stimmen mit den Spuren in Abbildung 11 überein.

Die untere Abbildung 11 zeigt das Coomassie gefärbte SDS-Polyacrylamidgel der Immunpräzipitation, aus dem zum ersten Mal Banden ausgeschnitten und die enthaltenen präzipitierten Proteine identifiziert wurden. Die massenspektrometrischen und folgenden Proteindatenbank-Analysen wurden im Labor von Dr. Martina Schnölzer in der Abteilung „Zentrale Proteinanalytik“ des DKFZ erstellt. Die Spuren 1, 3 und 5 zeigen die Immunpräzipitate, die aus der Inkubation mit dem Prä-Immunserum entstanden und die Spuren 2, 4 und 6 die Präzipitate, die aus der Inkubation mit dem Post-Immunserum resultierten. Bei Auftrag gleicher Volumina ist in den Spuren der Eluate mit Prä-Immunserum nichts zu sehen, was im Einklang steht mit der bereits gezeigten Spezifität der Post-Immunseren.



**Abbildung 11: Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der gebundenen Proteine der ersten Immunpräzipitation.** Von allen Präzipitaten wurden 30µl aufgetragen. Die Pfeile zeigen die Banden an, die ausgeschnitten und analysiert worden sind (s. Tabelle 6). Auf Höhe von 50kDa ist die Bande der schweren Kette der Immunglobuline zu erkennen.  
 Spur 1,3,5: Präzipitate aus den Ansätzen mit dem Prä-Immunserum mit 140, 70 oder 120µg Antigen  
 Spur 2,4,6: Präzipitate aus den Ansätzen mit dem Post-Immunserum mit 140, 70 oder 120µg Antigen

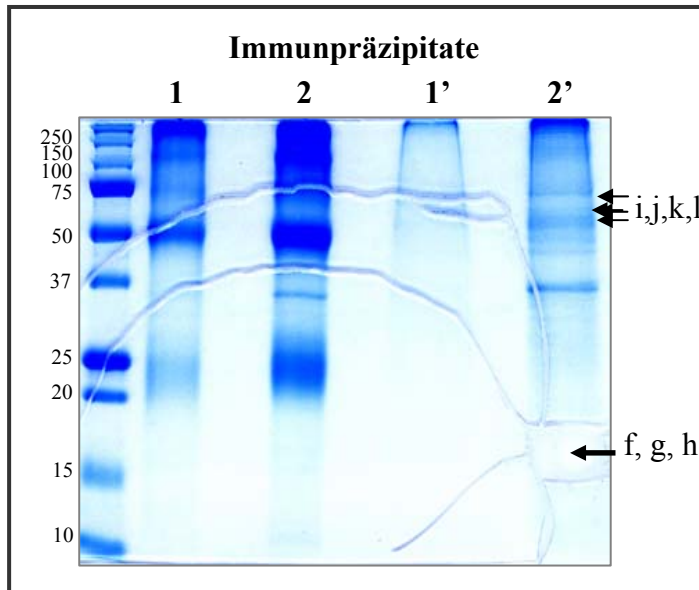
Die in den Banden vorhandenen Proteine wurden mit der massenspektrometrischen Analyse MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) analysiert, die durch einen proteolytischen Verdau das einzigartige Peptid-Profil eines Proteins ermittelt, über das mit Datenbank-Analysen seine Identifizierung ermöglicht wird (s. Beschreibung in Material und Methoden, Kapitel 2.7.).

Bei einer zweiten Immunpräzipitation mit je 860µg Antigen und 1mg Ak-gekoppelten Beads wurde eine Veränderung durchgeführt. Nach Elution wurde die Hälfte des Präzipitats (1ml) mit 500µg ungekoppelten Beads für 1h bei RT inkubiert. Da trotz Kreuzvernetzen der Antikörper an Protein A (das als Teil der Beads für die Bindung verantwortlich ist) während des Elutionsschrittes sich die IgG-Ketten im sauren Milieu (pH 2.5) ebenfalls ablösen können, sollten auf diese Weise die bei dieser Immunpräzipitation noch recht markanten Banden der schweren und der leichten Kette der IgGs bei 50kDa bzw. 25kDa reduziert werden. In der unteren Abbildung 12 ist zu sehen, dass die Behandlung effizient war. Spur 1 (Prä) und 2 (Post) sind die Immunpräzipitate ohne Behandlung und die Spuren 1' (Prä) und 2' (Post) die Immunpräzipitate mit Behandlung. Ausgangspunkt für diese Behandlung war die Überlegung, dass eventuell auf der gleichen Höhe der leichten und schweren Kette der Immunglobuline Banden anderer Proteine überlagert sein könnten. Tatsächlich sind in der Spur 2' Banden bei 50kDa und bei 25kDa sichtbar, die in Spur 2 durch die dicken IgG-Banden verdeckt sind.

Es wurden zunächst drei Banden um 15kDa aus Spur 2' (Pfeil f, g und h) MALDI-TOF Analysen unterzogen, die hier in Abbildung 12 nicht dokumentiert sind, da sie bereits aus dem Gel ausgeschnitten waren. Bei den Proteinen dieser Banden könnte es sich eventuell um die Proteine des Oberflächenpräparats handeln, die in der Reaktivitäts-Analyse von



Antikörpern des Post-Immunserums bereits stark erkannt worden sind (s. Spur PM in Abbildung 7, Kapitel 3.3.).



**Abbildung 12: Coomassie gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der gebundenen Proteine der zweiten Immunpräzipitation.** 30µl wurden von den Immunpräzipitaten jeweils aufgetragen. Die Präzipitate in Spur 1' und 2' wurden mit ungekoppelten Beads behandelt. Aus Spur 2', dem Immunpräzipitat mit dem Post-Immunserum, wurden drei Banden (f, g, h) bei ca. 15kDa (bereits aus dem Gel ausgeschnitten) und vier Banden zwischen 50 bis 75kDa (i,j,k,l) ausgeschnitten.

1: Präzipitat ohne Beads-Behandl. (Prä)  
2: Präzipitat ohne Beads-Behandl. (Post)  
1': Präzipitat nach Beads-Behandl. (Prä)  
2': Präzipitat nach Beads-Behandl. (Post)

Später wurden vier Banden zwischen 50 und 75kDa aus der Spur 2' (i, j, k und l in Abbildung 12) ausgeschnitten. Ihre enthaltenen Proteine wurden allerdings mit der massenspektrometrischen Analyse ESI-MS/MS (Electrospray ionization-mass spectrometry) analysiert, die anders als die MALDI-TOF Analyse die Identifizierung von mehreren Proteinen ermöglicht.

Aus den ausgeschnittenen Banden der SDS-Polyacrylamidgele beider Immunpräzipitationsvorgänge wurden folgende in der unteren Tabelle aufgeführten Proteine identifiziert.

**Tabelle 6: Banden und ihre präzipitierten und identifizierten Proteine<sup>1</sup>**

Ausgeschnittene Bande (Größe) <sup>2</sup>	Identifizierte Proteine (Molekulargewicht)
a (150kDa)	Glutamyl-Prolyl-tRNA Synthetase (160kDa)
b (150kDa)	Isoleucyl-tRNA Synthetase (145kDa)
c (75kDa)	Arginyl-tRNA Synthetase (76kDa)
d (50kDa)	Alpha Enolase (47kDa)
e (zwischen 37 und 25kDa)	Uracil-DNA Glycosylase (37kDa)
f (ca. 15kDa)	Ribosomales Protein S10 (19kDa)
g (ca. 15kDa)	Eukaryotischer Elongationsfaktor 1, ε1 (20kDa)
h (ca. 15kDa)	Cyclophilin A, Kette A (18kDa)

i (unter 75kDa)	1) Glutaminyl-tRNA Synthetase (88kDa) 2) Pro-Kollagen $\alpha$ 2 des Typs I (129kDa) 3) bovines Albumin (58kDa) 4) <b>Vorläufer des interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1, 58kDa)</b>
j (zwischen 50 und 75kDa)	1) Arginyl-tRNA Synthetase (76kDa) 2) Transketolase (68kDa)
k (etwas über 50kDa)	Chaperonin containing TCP1, Untereinheit theta (CCT-theta, 60kDa)
l (etwas über 50kDa)	1) CCT-delta (58kDa) 2) IgG, schwere Kette (Kaninchen, 36kDa)

<sup>1</sup>Die präzipitierten Proteine wurden mit den massenspektrometrischen Analysen MALDI-TOF und ESI-MS/MS und anschließenden Proteindatenbank-Analysen identifiziert.

<sup>2</sup>Zur Bezeichnung der Proteinbanden siehe Abbildung 11 Pfeile a-e und Abbildung 12 Pfeile f-l.

### Aus den Immunpräzipitaten wurden 17 Proteine massenspektrometrisch identifiziert.

Um für weitere Expressions-Analysen Proteine aus der Liste auswählen zu können, wurden zunächst Literaturinformationen über die Lokalisation und Zellfunktion aller identifizierten Proteine gesammelt:

Von allen identifizierten Proteinen gehören die drei Enzyme **Uracil-DNA-Glykosylase** (Teil der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), **Enolase** und **Transketolase** den Stoffwechselwegen Glykolyse bzw. Pentosephosphat-Weg im Zytosol an. Zwei weitere sind beteiligt bei der Proteinsynthese: das **ribosomale Protein 10** und die  **$\epsilon$ -Untereinheit des Translations-Elongationsfaktors 1**. **Pro-Kollagen  $\alpha$ 2 des Typs I**, das ein großer Bestandteil der extrazellulären Matrix ist, wurde ebenfalls identifiziert. Der Protein-Faltungskatalysator **Cyclophilin A** wurde sowohl in der Immunpräzipitations- als auch in der SEREX-Analyse (s. nächstes Kapitel) identifiziert. Zwei der Proteine sind methodisch bedingte Kontaminationen: das **bovine Albumin**, das als Bestandteil von fötalem Kälberserum in der Zellkultur verwendet wird, und die **schwere Kette des Kaninchen-Immunglobulins des Typs G**.

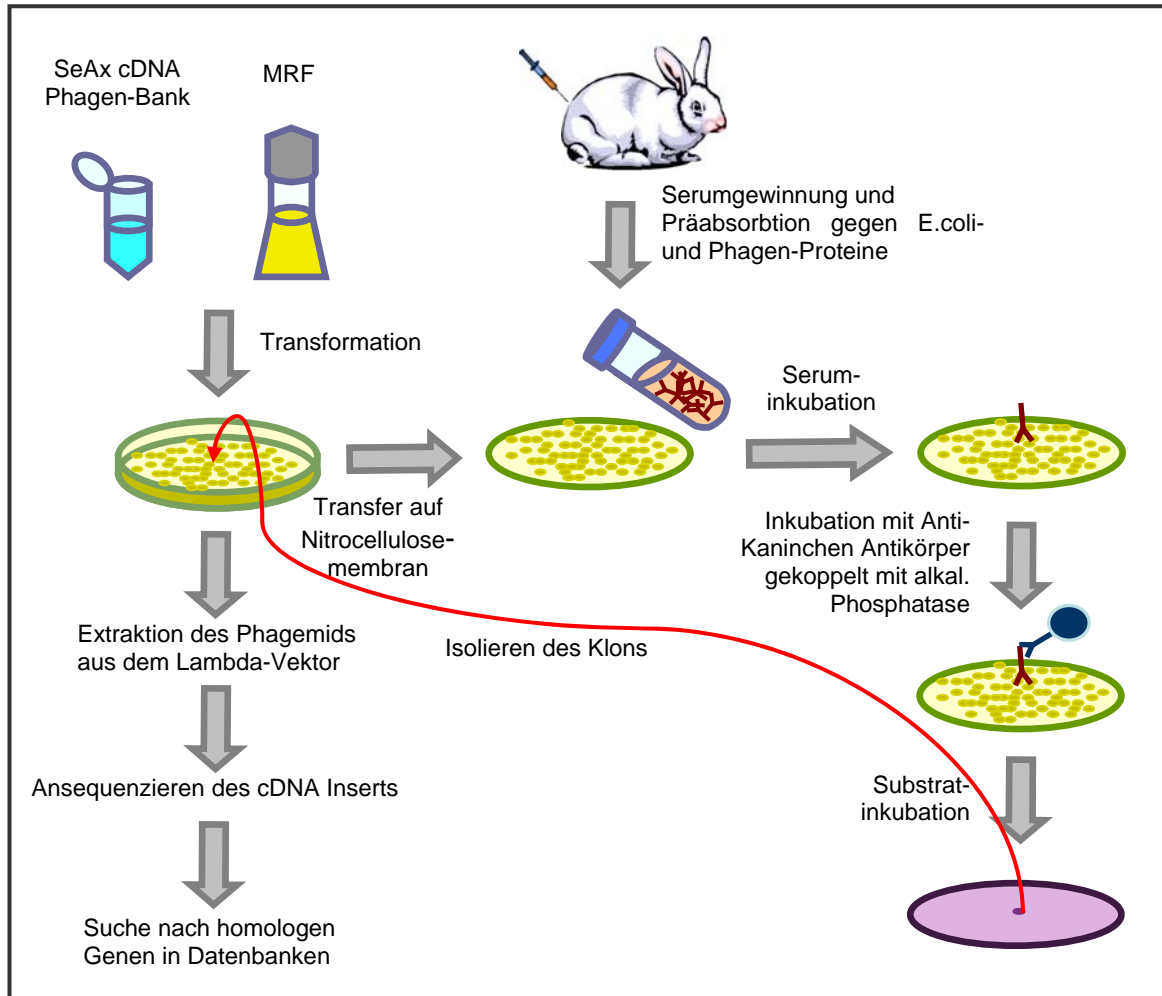
Auch wurden vier Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (ARS) die **Glutamyl-Prolyl-, Isoleucyl-, Arginyl- und Glutaminyl-tRNA Synthetase** identifiziert. ARS haben ihre Funktion in der Proteinsynthese. Der Grund, warum gleich vier dieser Proteine identifiziert wurden, liegt daran, dass alle vier Mitglieder des nukleären ARS-Komplexes sind. Er besteht insgesamt aus 9 verschiedenen Synthetasen und drei weiteren Proteinen, p43, p38 und p18 (Kerjan et al., 1994).

Der zweite Komplex, bzw. Untereinheiten des Komplexes, die in der Immunpräzipitation identifiziert worden sind, sind die Untereinheiten delta ( $\delta$ ) und theta ( $\theta$ ) des **TCP1**

**enthaltenden Chaperonins** (CCT, chaperonin containing TCP-1 [tailless complex polypeptide 1]). Bei diesem Komplex handelt sich um einen Faltungshelfer (Llorca et al., 1999). Er besteht aus einem Zylinder, der aus zwei Ringen mit jeweils 8 homologen Untereinheiten mit ATP-Bindestellen aufgebaut ist. Als Hauptsubstrate gelten Actin und Tubulin. Mit der Zeit wurden aber auch weitere Proteine gefunden (Valpuesta et al., 2002).

Zum Schluss konnte mit der ausführlicheren ESI-MS/MS-Analyse in der Bande i **der Vorläufer des Plasmamembranproteins ICAM-1** (Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) identifiziert werden. ICAM-1 wurde in Kapitel 3.1 zur Kontrolle der Plasmamembran-Anreicherung als Plasmamembran-Marker eingesetzt. ICAM-1 spielt wie sein Name sagt eine Rolle in der Adhäsion von Zellen an andere Zellen. Exprimiert wird das Adhäsionsprotein auf Endothelzellen und auch auf Lymphozyten. Als Bindungspartner dienen Integrine wie das Lymphozyten-Funktion-assoziierte Antigen-1 (LFA-1), die vor allem dazu beitragen, dass die ICAM-1-tragenden Lymphozyten durch die Blutgefäßwände wandern können (Boyd et al., 1988). Eine Studie zu ICAM-1 konnte ein zytokinabhängiges Ablösen des Proteins von der Zelloberfläche bei Tumorzellen des kutanen T-Zell Lymphoms zeigen (Dummer et al., 1994). Dieser Befund führte zur Entscheidung, ICAM-1 nicht mit weiteren Analysen auf seine Expression beim kutanen T-Zell Lymphom zu untersuchen. Da alle übrigen Proteine nicht in der Plasmamembran, sondern im Kern oder Zytosol lokalisiert waren und sehr häufig in der Zelle vorkommende Proteine sind, wurde auch von ihnen keins für weitere Analysen ausgewählt.

### 3.5. Die Analyse einer cDNA Phagenbank mit den Kaninchenseren identifiziert neben Plasmamembran- auch Nicht-Plasmamembranproteine



**Abbildung 13: Vorgehensweise der SEREX-Analyse.** Die Kaninchenseren wurden zunächst präabsorbiert und schließlich in der Analyse der SeAx cDNA-Phagenbank eingesetzt. Kam es zu positiven Reaktionen in Form von lila gefärbten Phagenplaques auf den Membranen, wurden diese isoliert und Phagemide extrahiert. Die inserierten cDNA-Stücke wurden ansequenziert und in Datenbanken nach homologen Genen gesucht.

Für die Identifizierung von Plasmamembranproteinen wurde als zweite Möglichkeit der komplette Transkriptsatz der kutanen T-Zell Lymphomlinie SeAx an Hand einer cDNA Phagenbank mit den Kaninchenseren durchsucht. SeAx ist eine aus peripheren Blutmonozyten einer Sézary Syndrom-Patientin etablierte CD4+ T-Zelllinie. Für die Analyse wurde die SEREX-Methode (Serological identification of antigens by recombinant expression cloning) verwendet, die bislang nur mit humanen Patientenseren nach reaktiven Expressionsklonen durchgeführt worden ist. Das Schema der Analyse ist in der obigen Abbildung 13 dargestellt.

Die eingesetzte cDNA Phagenbank wurde von Dr. Tanja Hartmann als Teil ihrer Diplomarbeit in unserer Gruppe hergestellt. Die cDNA Stücke wurden in das Defektgenom linearisierter pBluescript-Phagemide (ein M13-Derivat) inseriert, die wiederum in dem Lambda ZAP<sup>®</sup> II Vektor integriert waren. Die Bank besteht insgesamt aus ca.  $1,7 \times 10^6$  rekombinanten Phagen.

Zur Expression der inserierten cDNA wurden Bakterien des E. coli Stamms MRF mit den Phagen infiziert. Die entstandenen Phagenplaques mit den Expressionsprodukten der cDNA Stücke wurden auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Post-Immunsereen. Zuvor wurden die Seren beider Kaninchen 1:10 verdünnt von Antikörpern gegen bakterielle und Phagen-Proteinen gereinigt (Präabsorption). Dabei wurden sie mit E.coli und schließlich auch mit Phagen-Proteinen gemischt, die an eine Matrix gekoppelt waren, so dass alle gegen solche Proteine gerichteten Antikörper abgefangen wurden. Das gereinigte Serum wurde 1:100 verdünnt eingesetzt. Nach Inkubation der Nitrocellulosemembranen mit den Kaninchenseren wurden an rekombinante Phagenklone gebundene Antikörper von einem mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Anti-Kaninchen Antikörper erkannt.

Positive, d.h. reaktive Phagen wurden zum Teil in einem Gemisch mit umliegenden Klonen von der Ausgangsplatte gewonnen und in einer Wiederholung als positiv bestätigt. Anschließend wurde aus der DNA reaktiver Lambda Phagen das pBluescript-Phagemid mit der inserierten cDNA extrahiert. Dafür wurde ein weiteres M13-Derivat als Helferphage (ExAssist<sup>®</sup> der Firma Stratagene) verwendet, welcher für Proteine kodiert, die den Phagemid pBluescript aus dem Lambda Phagen ausschneiden und zirkularisieren. Anschließend wurden die inserierten cDNA Sequenzen mit Primern gegen die flankierenden Sequenzen (T3 oder T7) ansequenziert (s. Material und Methoden, Kapitel 2.9.). Nach Ansequenzierung der cDNA-Stücke wurde mit dem HUSAR-Programm „blastn2“ nach homologen Genen in verschiedenen Banken (GenBank und EMBL Bank) durchsucht.

Geht man davon aus, dass eine Petrischale mit einem Durchmesser von 14,5cm bei hoher Dichte ca. 3000 Plaques enthält, müssten insgesamt 570 Platten ausplattiert werden, um statistisch gesehen jedes cDNA-Molekül der Bank mindestens einmal erfassen zu können. Insgesamt wurden 558 große Platten mit dem Endserum des ersten Kaninchens und 361 große Platten mit dem Endserum des zweiten Kaninchens eingesetzt.

Zusammengefasst wurden 90 reaktive Phagenklone isoliert und ihre inserierten cDNA Stücke identifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass in mehreren Phagenklonen cDNA-Inserts

vorlagen, die für identische Proteine kodierte. Insgesamt wurden daher 42 verschiedene cDNA Inserts identifiziert: Davon kodierte acht für nukleäre, vier für zytoplasmatische, drei für ribosomale, drei für ER-, eins für Golgi-, zwei für mitochondrielle, drei für mit subzellulär mehreren Lokalisationen, 14 für in der Lokalisation und auch Funktion unbekannte und vier für plasmamembranständige Proteine.

In der unteren Tabelle 7 sind die reaktiven Phagenklone und deren identifizierte cDNA-Inserts mit ihren Datenbank-Zugangsnummern (Accession Nr.) vorgestellt und nach ihrer Lokalisation eingeteilt.

**Tabelle 7: Phagenklone mit ihren identifiziertem cDNA-Inserts<sup>1</sup>**

Klon	Name	Accession Nr.
<b>Gruppe 1: Nukleäre Lokalisation</b>		
A2	Spleißfaktor, Arginin/Serin-reich 11	Bc017359
D8	Nuclear P1 (Mcm3 Homolog)	X62153
E4	hZimp10 (human zinc finger-containing, Miz1, PIAS-like protein of chromosome 10)	Ay235683
Ma3	FOX M1 (Fork head box M1)	L16783
Ma4	AIP (Aurora A kinase interacting protein)	Bc062333
V1	Homer homolog 1	Bc015502
3e	Braf25 (Spleißvariante von Braf 35)	Bc002552
<b>Gruppe 2: Zytoplasmatische Lokalisation</b>		
D6	RRM2 (Ribonucleotide Reductase M2)	X59618
L7	RAB2L (Mitglied der RAS Onkogen Familie-ähnlichen)	U68142
4a	Nedd5	Af038404
mehrere	Lysyl-tRNA Synthetase	D32053
<b>Gruppe 3: Ribosomale Lokalisation</b>		
N8	Eukaryot. Translat. Initiat. Factor 4a, isoform 1	Bc009585
Y2	Ribosomales Protein S6	Ab062123
2f	Elongationsfaktor 1 alpha, subunit 1	X03558
<b>Gruppe 4: Lokalisation im Endoplasm. Retikulum</b>		
4d	Stearoyl-CoA desaturase 4	Af389338
mehrere	Cytochrom b5	Ab009282
mehrere	Calnexin	M94859
<b>Gruppe 5: Lokalisation im Golgi Netzwerk</b>		
D13	Rab10	Af106681
<b>Gruppe 6: Mitochondrielle Lokalisation</b>		
Z1	Caseinolytic protease X (ClpX) like protein	Aj006267
9d	ATP-abhäng. Metalloprotease YME1L1 (FtsH1 Homolog)	Af151782
<b>Gruppe 7: Mit mehreren subzell.Lokalisationen</b>		
viele	Ku86	M30938
N9	Hitzeschock 70kDa protein 8, Transkriptionsvariante 1	Bc019816

Ma5	Peptidylprolylisomerase A (Cyclophilin A)	Bc005982
2c	CCT-zeta (Chaperonin containing TCP1, zeta)	L27706
<b>Gruppe 8: Mit unbekannter Lokalisation</b>		
C3	Bac clone RP11-555K2	Ac018692
E3	Bac clone XXbac-55C20	Ai591044
U2	GAS5 (Homo sapiens growth arrest-specific 5)	Bc038733
Ma2	KIAA1191 Protein	Cb155134
Ma6	UBX domain containing 2 protein	D87684
Z2	Zink finger Protein 292	Ab011102
G5	Zink finger Protein 238 (RP58)	Bc036677
Z5	Chromosom 14, ORF 149	Bi828749
2a	FK506 binding protein 5	Bc042605
3b	Protein X 0004	Bc008416
3c	RNA-binding motif Protein 25	Ak125513
3d	Hypothetisches Protein FLJ11730	Bc056406
3g	Klon CTB-193M12	Ac026401
8e	Cep290 (centrosomal protein 290) oder auch se2-2	Af273044
<b>Gruppe 9: Plasmamembran-Lokalisation</b>		
A3	Integrin alpha 4 (CD49D)	L12002
C4	Ligatin	Bc058905
U1	MT5-MMP (auch MMP24)	Bc047614
9a	MHC Klasse 1, HLA-A	X13111

<sup>1</sup>Die Sequenzen der cDNA-Inserts wurden mit dem HUSAR-Programm „blastn2“ in Datenbanken nach homologen Sequenzen analysiert.

Die in ihrer Lokalisation unbekannten Proteine, die in Gruppe 8 der Tabelle 7 zusammengefasst sind, wurden mit Computeranalysen auf Membran-Motive und eine Plasmamembran Lokalisierung untersucht (s. Material und Methoden, Kapitel 2.8.). Für keines dieser Proteine ergab sich eine Plasmamembran-Lokalisation. Sie werden daher im Folgenden nicht mehr angesprochen.

### **Die Literaturrecherchen ergeben für einige der in ihrer Lokalisation bereits bekannten Proteine Aufgaben bei Tumoren.**

Für weitere Expression-Analysen sollten zunächst von allen bekannten Proteinen aus Tabelle 7 Informationen über ihre Funktionen und auch welche über ihre mögliche Rolle bei Tumoren gesammelt werden. Nach Literaturrecherchen können sie daher außer nach ihrer subzellulären Lokalisation, wie sie in der obigen Tabelle zusammengefasst sind, auch nach ihren Funktionen kategorisiert werden:

Die erste große Gruppe bilden dabei diejenigen, die in der Proteinsynthese involviert sind: Das **ribosomale Protein S6** (Klon Y2), der **Translations-Initiationsfaktor 4a** (N8), der

**Translations-Elongationsfaktor 1 $\alpha$**  (2f) und **Lysyl-tRNA Synthetase** (drei Klone) sind direkt in der Peptidsynthese beteiligt, wohingegen die Chaperone **Calnexin** (zwei Klone), **caseinolytische Protease X ähnliches Protein** (Z1, ClpX), **Hitzeschockprotein 70** (N9, Hsp70) und die **zeta-Untereinheit des TCP-1 enthaltenden Chaperonins** (Chaperonin containing TCP-1 [tailless complex polypeptide 1], subunit zeta, 2c), die naszierenden Proteine zu ihrer richtigen Faltung verhelfen. **Cyclophilin A** (Ma5) ein weiteres Chaperon wurde bereits in der Immunpräzipitation identifiziert und kann bis zu 2% des Gesamt-Proteingehalts einer Zelle ausmachen. **Rab10** (D13) ist am Transport von Vesikeln innerhalb des Golgi-Apparates beteiligt. Der **Arginin/Serin-reiche Spleißfaktor 11** (A2) arbeitet einen Schritt vor den bereits genannten Proteinen bei der Reifung der Prä-mRNA. **Ribonukleotid Reduktase M2** (D6, RRM2) liefert Vorläufer für die DNA-Synthese und steht damit ganz am Anfang im Syntheseprozess. Zwei Faktoren, die im Lipidsynthese-Vorgang beteiligt sind, wurden ebenfalls in der Analyse identifiziert: **Stearoyl-CoA-Desaturase 4** (4d) und **Cytochrom b5** (fünf Klone).

Desweiteren wurden auch Proteine gefunden, die in der Regulation von Replikation eine Funktion haben wie **Nuclear P1** (Klon D8, (Hu et al., 1993) und das nukleäre **Aurora A Kinase interacting protein** (Ma4), das inhibitorisch auf die Aurora A Kinase wirkt. Mitglieder der Aurora A Kinasen regulieren die Struktur und Funktion der Zentrosomen und des Spindelapparates und werden als Onkogene diskutiert (Kiat et al., 2002). Der **BRCA2-assoziierte Faktor 25** (3e, Braf25) ist eine Spleißvariante von Braf35, das im Komplex mit BRCA2 (Breast Cancer gene 2) mitverantwortlich ist in der Kontrolle der Zellzyklusprogression (Wang et al., 2002a).

Einige der Proteine lassen sich schwer in Gruppen zusammenfassen wie das **Homer Homolog 1** (V1), das seine Aufgabe im Calcium-Signalweg hat. Es bindet dabei an den metabotropischen Glutamat-Rezeptor, der wiederum durch Spaltung von Membranlipiden die Aktivierung anderer Mitglieder der Signalkaskade auslöst, was schließlich die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem Endoplasmatischen Retikulum bewirkt (Behr et al., 1999). **RAB2L** (Abkürzung ist in der Literatur nicht erklärt, Klon L7) weist Homologien zum Ral-Guanin Nukleotid Dissoziierungsstimulator (RalGDS) auf, das wiederum aktivierend auf Ral, einem Mitglied der Ras-Familie, fungiert (Isomura et al., 1996). **Nedd5** (4a) gehört zur Familie der Septine. Sie haben eine GTPase-Aktivität und sind im Zytoskelett lokalisiert. Ihre Aufgaben sind vor allem in der Zytokinese zu finden (Sakai et al., 2002). Es wurde auch die **Hefe Methyl-Esterase 1-ähnliche ATP-abhängige Metalloproteinase 1** (YME1L1, Klon 9d) gefunden, die im mitochondriellen Proteinmetabolismus involviert ist.



Von den 90 reaktiven Phagenklonen enthielten 40 Klone das umgeschriebene Transkript für **Ku86**. Es bildet mit Ku70 zusammen das Ku Autoantigen. Es wurde zum ersten Mal durch Auto-Antikörper in verschiedenen Seren von Patienten mit dem Sklerodermapolymyositis überlappenden Syndrom entdeckt (Mimori et al., 1990). Später fand man Ku86 und Ku70 involviert in vielen Prozessen wie i) dem DNA Doppelstrang-Bruch Reparaturmechanismus, ii) der V(D)J Rekombination der Immunglobulin- und T-Zellrezeptor-Gene, iii) der DNA-Replikation, iv) Regulation von Hitzeschock-induzierten Antworten und v) Schutz der Chromosomen über die Telomer-Erhaltung.

**hZimp10** (human zinc finger-containing, Miz1, PIAS-like protein of chromosome 10, Klon E4) ist in einer Yeast-two-hybrid Suchanalyse nach Androgen-Rezeptor interagierenden Proteinen gefunden worden (Sharma et al., 2003). Der nukleäre Androgen-Rezeptor spielt eine zentrale Rolle in der männlichen Geschlechts- aber auch der Prostatakrebsentwicklung (Jenster, 1999). Die Studie entdeckte mit hZimp10 einen neuen Regulator für den Androgen-Rezeptor, der durch Sumoylierung für eine verstärkte Aktivität des Rezeptors in Prostata-Tumorzellen sorgt. Sie fanden außer in Prostata-Tumorzellen auch eine Expression vor allem in gesundem Ovarialgewebe, Prostata, Testis und auch Milz. Lediglich eine schwache Expression konnte auch in peripheren Blutlymphozyten beobachtet werden.

**Forkhead Box M1** (FOXM1, Klon Ma3), früher auch bekannt als MPP2/MPHOSPH2 oder Trident/FKHL16 (Korver et al., 1997), gehört zu der großen Familie der Fox Transkriptionsfaktoren. Sie sind durch ein 100AS langes, konserviertes Winged-helix DNA-Bindemotiv gekennzeichnet (Clark et al., 1993). Für den Menschen sind mehr als 50 Mitglieder beschrieben. Das 85kDa große FOXM1 ist ubiquitär in proliferierenden Zellen des Embryonalgewebes exprimiert und spielt dabei eine wichtige Rolle im Zellzyklus.

### **Vier bekannte Plasmamembranproteine wurden mit den Kaninchenseren identifiziert.**

Als erstes Plasmamembranprotein wurde **Ligatin** (C4) identifiziert. Es dient als Bindungspartner von peripheren Phosphoglykoproteinen an der externen Zelloberfläche (Marchase et al., 1982). Ligatin war in einer SEREX-Suche nach hepatozellulären Karzinom-Tumorantigenen identifiziert worden (Wang et al., 2002c). Folgende Analysen ergaben jedoch eine ubiquitäre Expression.

Das humane MHC I-Protein, **HLA-A** (human leukocyte antigen, type A, Klon 9a) wurde ebenfalls identifiziert. MHCI wird auf Zellen jedes Typs exprimiert und ist mit seiner

Antigenpräsentation in der Aktivierung von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und somit in der zellulären Immunantwort involviert.

Das Plasmamembranprotein **MT5-MMP** (membrane-type 5 matrix metalloproteinase, Klon U1) gehört zur Familie der Matrix Metalloproteinasen. Zusammen mit löslichen Formen bilden membranständige MMP eine Familie von Zink-bindenden Endopeptidasen, die für die Degradation der extrazellulären Matrix hauptverantwortlich sind. MT5-MMP wurde zum ersten Mal 1999 vorgestellt. Die fünfte membranständige Form wurde aus einer Maus GehirncDNA Bank isoliert und identifiziert (Pei, 1999). Es stellte sich heraus, dass die murine Form mehr als 95% homolog zur humanen Form ist. Das 58kDa große MT5-MMP, auch unter MMP24 bekannt, gehört mit seiner Transmembrandomäne zu den membranständigen Metalloproteinasen MT1-, MT2- und MT3-MMP. Wie andere MT-MMP ist auch MT5 in der Lage MMP2, die Progelatinase A, zu aktivieren. Untersuchungen ergaben, dass MT5-MMP außer MMP2 auch den Metastasierungssuppressor KiSS-1/Metastin (SS, suppressor sequence) moduliert. Erste Expressions-Analysen ergaben eine Expression in adultem Normalgewebe von Gehirn, Niere, Pankreas und Lunge (Llano et al., 1999; Pei, 1999).

**Integrin  $\alpha 4$**  (Klon A3) gehört zur Familie der Integrine, die aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -heterodimeren Plasmamembranproteinen bestehen. Für ihre Aktivierung sind divalente Kationen notwendig. Vorrangig spielen sie eine Rolle in Adhäsionsvorgängen zwischen Zellen und Zellen mit Komponenten der extrazellulären Matrix. Ihre zytoplasmatische Domäne steht dabei mit F-Actin und Proteinen von Signalketten in Wechselwirkung. Die  $\alpha 4$ -Untereinheit, auch als CD49d bekannt, bildet mit  $\beta 7$  und  $\beta 1$  die Integrine VLA-4 (very late antigen-4) bzw. LPAM-1 (lymphocyte Peyer's patch adhesion molecule-1), die auf den meisten Leukozyten-Zelltypen exprimiert werden. Sie fungieren als Rezeptoren des vaskulären Zell-Adhäsionsmoleküls (VCAM-1), das auf aktivierten Endothelzellen exprimiert wird. Sie binden auch Fibronectin, ein in der extrazellulären Matrix und im Blut verbreitetes adhäsives Protein. Das Heterodimer  $\alpha 4\beta 7$  interagiert zusätzlich noch mit dem mukosalen Addressin Zell-Adhäsionsmolekül-1 (MAdCAM-1). Die Bindung an ihre Partner ist vor allem im sogenannten Homing der Leukozyten wichtig. Bei diesem Vorgang handelt es sich um den Austritt aus dem Blutgefäß ins Zielgewebe (Extravasation) wie zum Beispiel bei Entzündungsreaktionen.

**Für weitere Analysen sind ausgewählt: die Plasmamembranproteine MT5-MMP und Integrin  $\alpha 4$  und die Nicht-Plasmamembranproteine hZimp10, FOXM1 und Ku86.**

Auf Basis der aus der Literatur erhaltenen Informationen über ihre Lokalisation, ihren Zellfunktionen und auch möglichen Rollen in Tumorgenese (hier nicht aufgeführt) wurden einige der identifizierten bekannten Proteinen der SEREX-Analyse für weitere Analysen ausgewählt: Die beiden nukleären Proteine hZimp10 und FOXM1, sowie die beiden Plasmamembranproteine MT5-MMP und Integrin  $\alpha 4$ . Sie sollten mit Real-time PCR und teilweise auch mit Western Blot Analysen auf ihre Expression beim kutanen T-Zell Lymphom untersucht werden.

Desweiteren wurde als fünftes Protein für eingehendere Untersuchungen das in mehreren Zellkompartimenten vorliegende Protein Ku86 vorgesehen, das in nahezu der Hälfte aller reaktiven Phagenklone inseriert war (40 von 90 Klonen). Es sollte auf eine mögliche Lokalisation in der Plasmamembran analysiert werden.

### **3.6. Bei Zellen der kutanen T-Zell Lymphomlinie HuT78 ist das Nicht-Plasmamembranprotein Ku86 auch Teil von „Lipid rafts“**

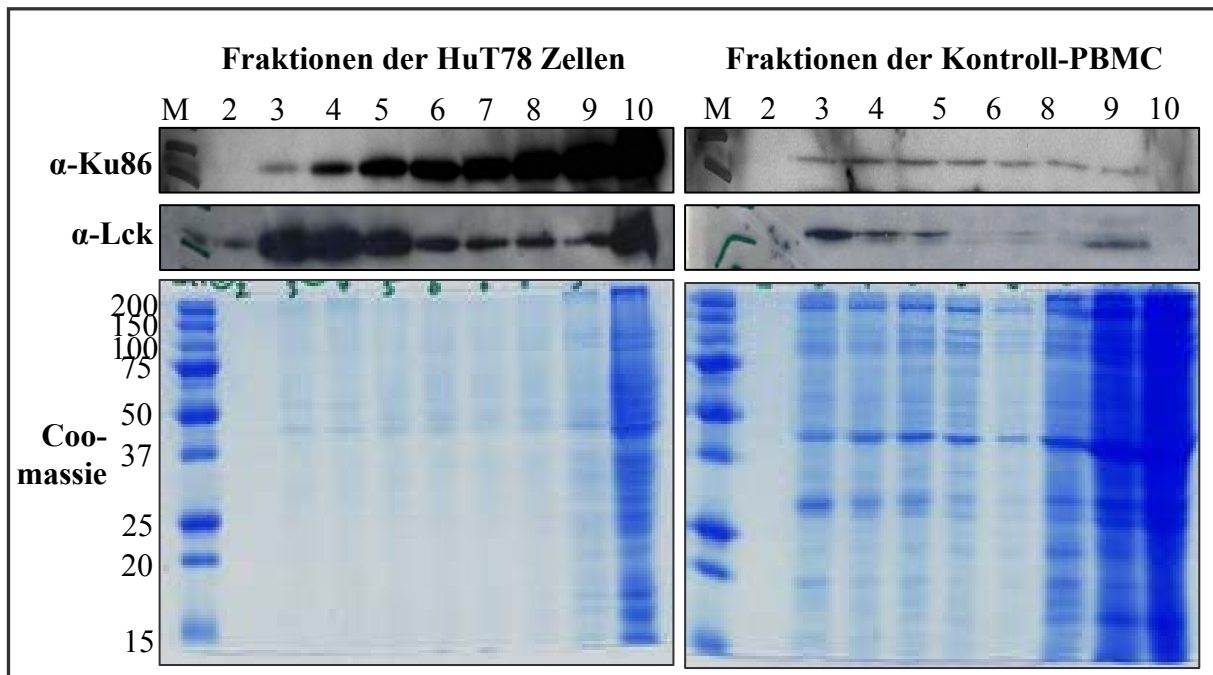
Das in Tabelle 7 vorgestellte intrazelluläre Protein Ku86 ist in der SEREX-Analyse sehr oft identifiziert worden. Ein nicht abwegiger Grund für seine häufige Identifizierung könnte eine hohe Transkriptzahl in der cDNA Phagenbank oder auch eine starke Immunogenität des Proteins sein, so dass die Kaninchen verstärkt Antikörper gegen das humane Ku86 generierten. Es wäre aber auch möglich, dass eine Plasmamembranständigkeit des Proteins vorliegt.

Daher wurde untersucht, ob Ku86 in der Plasmamembran der HuT78-Zelle lokalisiert ist, speziell in Detergenz-resistenten Membrandomänen, sogenannten „Lipid rafts“. Die Wahl der Kontrollzellen fiel auf mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) eines gesunden Probanden. Für die Analyse wurden  $3 \times 10^8$  HuT78-Zellen und der Kontrollzellen zunächst homogenisiert, mit Triton X-100 bei 4°C behandelt und schließlich mit einem diskontinuierlichen Sukrose-Dichtegradienten aufgetrennt. Die Zellsuspensionen wurden dabei in 40% Sukrose eingegeben und mit 30% und 5% Sukrose in Puffer überschichtet. Die Proteinkomplexe flotieren durch den Sukrose-Gradienten und lagern sich ihrer Dichte entsprechend an.

Aufgrund der Resistenz gegen nicht-ionische Detergenzien bleiben „Lipid rafts“ auch nach Behandlung mit Triton X-100 bei 4°C in ihrer Form stabil und flotieren aufgrund ihrer geringeren Dichte nach oben in den Bereich zwischen 5% und 30% Sukrose. Nach der Zentrifugation wurden 1ml-Fraktionen von oben der Dichtegradienten abpipettiert und jeweils ein Aliquot auf SDS-Polyacrylamidgele geladen. In Abbildung 14 sind die Western Blot Analysen der Gradienten-Fraktionen mit Antikörpern gegen Ku86 und Lck dargestellt. Lck ist ein T-zellspezifisches Mitglied der Src-Kinase-Familie und dient hier als „Lipid raft“ Marker. Im unteren Teil sieht man Coomassie gefärbte Gele, die einen Vergleich der aufgetragenen Gesamt-Proteinmengen erlauben.

Aufgrund des Abpipettierens von oben, steigt die Dichte in Abbildung 14 von links nach rechts an. Die Spuren 3, 4 und 5 in der Abbildung stellen die „Lipid rafts“ Fraktionen dar, was durch die starken Signale mit dem  $\alpha$ -Lck Antikörper deutlich wird. Die Spuren 5 bis 9 (bei Kontroll-PBMC bis 10) enthalten die Detergenz-löslichen Proteine der Zelle. Die letzten Spuren (Spur 10 bei HuT78 und Spur 11 bei Kontroll-PBMC) bestehen aus größeren Zellfragmenten, die eine höhere Dichte als 40% Sukrose aufwiesen und daher durch die Zentrifugation pelletiert wurden. Spur 11 der Kontroll-PBMC weist allerdings in allen

Analysen keine Bande auf, da sich offensichtlich beim Blotten eine Luftblase an dieser Stelle befand. Diese Spur ist allerdings für die Analyse nicht relevant.

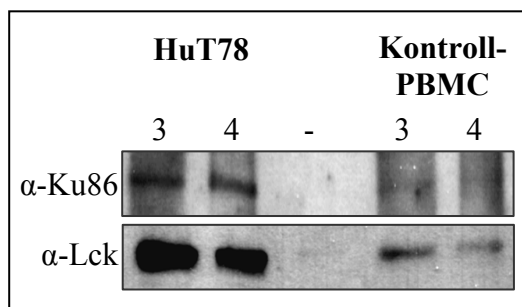


**Abbildung 14: Lokalisierung von Ku86 in „Lipid rafts“ von CTCL-Zellen und Kontroll-PBMC.** HuT78 Zellen und PBMC eines gesunden Probanden wurden mit Triton X-100 behandelt und in einer diskontinuierlichen Sukrose-Dichtegradienten-Zentrifugation aufgetrennt. Die Nummerierung der aufgetragenen Spuren entspricht dabei den von oben abgenommenen Fraktionen des Gradienten. Von allen Fraktionen wurden jeweils 35µl aufgetragen. Alle Western Blot Analysen wurden mit einem Blot durchgeführt. Ein äquivalent aufgetragenes SDS-PAGE-Gel wurde Coomassie gefärbt. In Spur 8 der Kontroll-PBMC ist offensichtlich weniger als 30µl aufgetragen worden. Spur M: Marker; Spuren 3, 4, 5: „Lipid rafts“ Fraktionen; Spuren 5-9 (HuT78) bzw. 5-10 (Kontroll-PBMC): Detergenz-lösliche Proteine; Spur 10 bzw. 11 (Kontroll-PBMC): größere, pelletierte Zellfragmente

Mit näherer Betrachtung sind bei den Kontroll-PBMC zwei Banden von Lck zu sehen. In den Spuren 3, 4 und 5 ist die obere Bande stärker, in den Spuren 6, 8 und 9 sind beide gleich stark und in der Spur 10 ist die untere wiederum stärker. Lck trägt im aktivierten Zustand Phosphat-Reste, die die unterschiedlichen Größen des Proteins verursachen. Das Coomassie gefärbte Gel der HuT78-Proben ist schwächer als das der Kontroll-PBMC, das auf eine niedriger aufgetragene Gesamt-Proteinmenge deutet. Offensichtlich ist während der Prozedur ein Teil der HuT78-Probe verloren gegangen.

Betrachtet man die Signale mit dem Ku86-Antikörper zunächst in den Fraktionen der Kontroll-PBMC, so lässt sich eine Gleichverteilung über alle Fraktionen hinweg beobachten (s. Abbildung 14 rechts), wohingegen in HuT78-Zellen die Signale mit zunehmender Fraktionsnummer in den löslichen Fraktionen stärker wird (s. Abbildung 14 links). Dennoch liegt eine gewisse Menge an Ku86 in den „Lipid rafts“ Fraktionen der HuT78 Zellen vor.

Allerdings ist die Proteinmenge an Ku86 in den HuT78-Fraktionen allgemein so hoch, dass die in den „Lipid raft“ Fraktionen enthaltenen Mengen lediglich diffundiertes, lösliches Ku86 sein könnten. Um dies auszuschließen, wurde ein zweiter Sukrose-Stufengradient mit höheren Konzentrationen gefahren. Dabei wurden die „Lipid rafts“-Fraktionen (Fraktionen 3, 4, und 5) der ersten Zentrifugation zunächst vereinigt und in 50% Sukrose eingegeben. Beschichtet wurde dieses Gemisch mit 40%igem und schließlich mit 5%igem Sukrose-TKM-Puffer. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden 1ml-Fraktionen von oben abpipettiert. Die neu entstandenen Fraktionen 3 und 4 stellen wieder die Fraktionen der „Lipid rafts“ dar (siehe Lck-Signal in Abb. 15).



**Abbildung 15: Bestätigung der Lokalisierung von Ku86 in den „Lipid rafts“ von CTCL-Zellen.** Mit einer zweiten Zentrifugation konnte Ku86 erneut in den „Lipid rafts“-Fraktionen von HuT78 und Kontroll-PBMC detektiert werden. Von den Fraktionen 3 und 4 der HuT78 und auch Kontroll-PBMC wurden 30µl aufgetragen. Die Nummerierung entspricht den von oben abgenommenen 1ml-Fraktionen. Für die Analyse wurden zwei Blots verwendet und mit den gleichen Antikörpern wie in Abbildung 14 inkubiert.

Es wurde erneut Ku86 in den „Lipid rafts“ Fraktionen des zweiten Gradienten in beiden Gruppen, HuT78 und Kontroll-PBMC, nachgewiesen. Dabei ist die Ku86-Menge auch durch den höher konzentrierten Sukrose-Gradienten in die obere Phase floriert und stammt dabei nicht aus einem stark Ku86-konzentrierten Zellgemisch, sondern aus den „Lipid rafts“ Fraktionen der ersten Zentrifugation (s. Abbildung 14 Fraktionen 3, 4 und 5). Somit könnte das hier nachgewiesene Ku86 tatsächlich in „Lipid rafts“ lokalisiertes Protein sein. Ein zusätzlicher Hinweis ist das gleiche Mengenverhältnis von Ku86 zu Lck in den Fraktionen, was sowohl in Abbildung 14 als auch in Abbildung 15 zu sehen ist.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Western Blot Analysen der Fraktionen beider Zentrifugationen, dass unabhängig der Verteilung von Ku86 innerhalb der Zelle seine Gesamtmenge in den HuT78 Zellen entscheidend höher ist als in der Kontroll-PBMC-Probe, was im Hinblick auf das Coomassie gefärbte Gel der Abbildung 14 deutlich wird. Über eine Rezentrifugation wurde bestätigt, dass es sich bei den nachgewiesenen Ku86-Mengen in den „Lipid rafts“ Fraktionen tatsächlich um Ku86-Protein handelt, das in diesen Membrandomänen lokalisiert ist.

Trotz der Tatsache, dass mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) aus etwa einem Viertel Nicht-T-Zellen nämlich B-Zellen, natürlichen Killerzellen und Monozyten bestehen,

die Lck nicht exprimieren, scheint die Menge an Lck in HuT78-Zellen erhöht. Betrachtet man die Lck-Signale in den HuT78-Fractionen, so erscheinen sie auch unter Rücksichtnahme der niedriger beladenen Gesamt-Proteinmenge bei HuT78 (siehe Comassie-Färbung) viel stärker.

### **3.7. Beim kutanen T-Zell Lymphom wurde eine von Normalzellen abweichende Transkriptionshöhe von hZimp10, FOXM1 und MT5-MMP nicht aber von Integrin $\alpha$ 4 gefunden**

Zu den aus der SEREX-Analyse ausgewählten Proteinen MT5-MMP, Integrin  $\alpha$ 4, hZimp10 und FoxM1 wurden Real-time PCR Analysen durchgeführt um ihre Transkriptionshöhen bei Patienten mit kutanem T-Zell Lymphom zu erfassen. Dabei wurden als erste Gruppe Hautproben von sieben Mycosis fungoides-Patienten (Stadium IIb-IVa), als zweite Gruppe Hautproben von fünf Patienten mit benignen inflammatorischen Hauterkrankungen wie Dermatitis (zwei Proben) und verschiedenartigen Ekzema (drei Proben) und als dritte Gruppe Hautproben sechs gesunder Probanden untersucht. Zusätzlich wurden als vierte Gruppe PBMC-Proben von fünf Sézary Syndrom-Patienten (hauptsächlich Stadium IV) und von fünf gesunden Probanden als fünfte Gruppe analysiert. Für die cDNA Synthese wurden in Ansätzen von 20  $\mu$ l jeweils 1  $\mu$ g Gesamt-RNA verwendet. Für die PCR-Analyse wurde schließlich 1  $\mu$ l der cDNA-Probe eingesetzt (s. Material und Methoden, Kapitel 2.12.).

Für die Spezifität der jeweiligen Analysen wurden zunächst die Amplifikate der PCR-Ansätze getestet. Sie wurden dafür über Agarose-Gelelektrophorese auf das Vorliegen weiterer unspezifische Banden untersucht und das PCR-Produkt mit einer Sequenzierung bestätigt (Analysen sind hier nicht gezeigt). Desweiteren wurden auch die Primer auf Dimerisierung in einer Schmelzkurven-Analyse getestet. Erwiesen sich alle ausgewählten Bedingungen für die Analysen als geeignet, wurden zunächst aus den PCR-Produkten Proben mit definierten Molekülzahlen angefertigt und mit ihnen eine Standardreihe erstellt (s. Material und Methoden, Kapitel 2.13). So war es auch möglich die Transkriptzahlen in den zu untersuchenden Proben zu ermitteln, da ihre Fluoreszenz-Daten mit denen der Standardreihe verglichen wurden, deren Transkriptzahlen dem Messgerät eingegeben waren. Ein Beispiel ist im Anhang 1 beigelegt. Im weiteren Verlauf sollen die auf diesem Wege ermittelten Transkriptzahlen als sogenannte abgeleitete Transkriptzahlen bezeichnet werden.

Um die erhaltenen Werte auch in Beziehung zueinander sehen zu können, wurde in allen Proben als Referenzgen die konstitutiv exprimierte Hydroxymethyl-Bilane Synthase, kurz HMBS, gemessen. HMBS ist ein Haushaltsgen, das auf niedrigem Niveau exprimiert wird und daher als Referenz für schwach exprimierte Gene gut geeignet ist.

Die PCR-Messungen wurden durchweg mit 40 Zyklen durchgeführt. Die Annealing-Temperatur für die Transkriptmessung von MT5-MMP lag bei 66°C, von Integrin  $\alpha$ 4 bei 59°C, von hZimp10 bei 60°C, von FOXM1 bei 62°C und von HMBS bei 64°C.

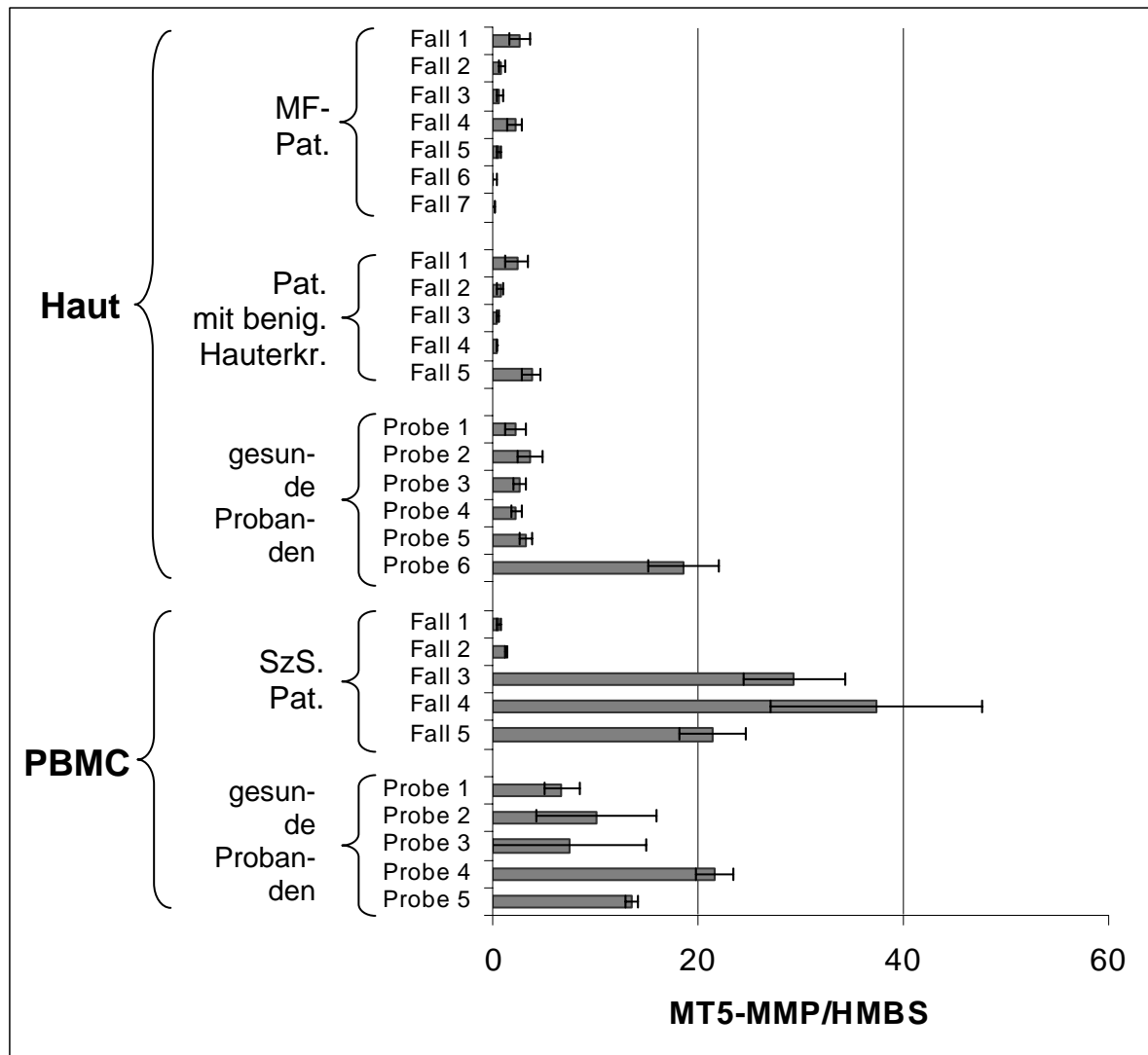


Die Messungen der Proben erfolgte in 96 Lochplatten, wobei von jeder Probe drei Parallelmessungen und von den Standardproben zwei Parallelmessungen durchgeführt wurden. Alle Proben wurden in zwei Durchgängen für jedes Gen getestet, d.h. jedes Gen wurde in jeder Probe sechsmal getestet. Schließlich wurden die Mittelwerte der abgeleiteten Transkriptzahlen errechnet und durch die der Referenzgen-Werte dividiert. Die entstandenen Quotienten sollten das Verhältnis der jeweiligen Gene zu HMBS anzeigen. Um sie im Vergleich miteinander sehen zu können, wurden sie schließlich in einem Diagramm dargestellt. Alle abgeleiteten Transkriptzahlen der Analysen sind im Anhang 2 tabellarisch dargestellt.

## Die Transkriptionshöhe der Matrix Metalloproteinase MT5-MMP ist bei Mycosis fungoides Patienten erniedrigt.

Das erste untersuchte Plasmamembranprotein, das aus den identifizierten Proteinen der SEREX-Analyse ausgewählt worden war, ist die Matrix Metalloproteinase MT5-MMP.

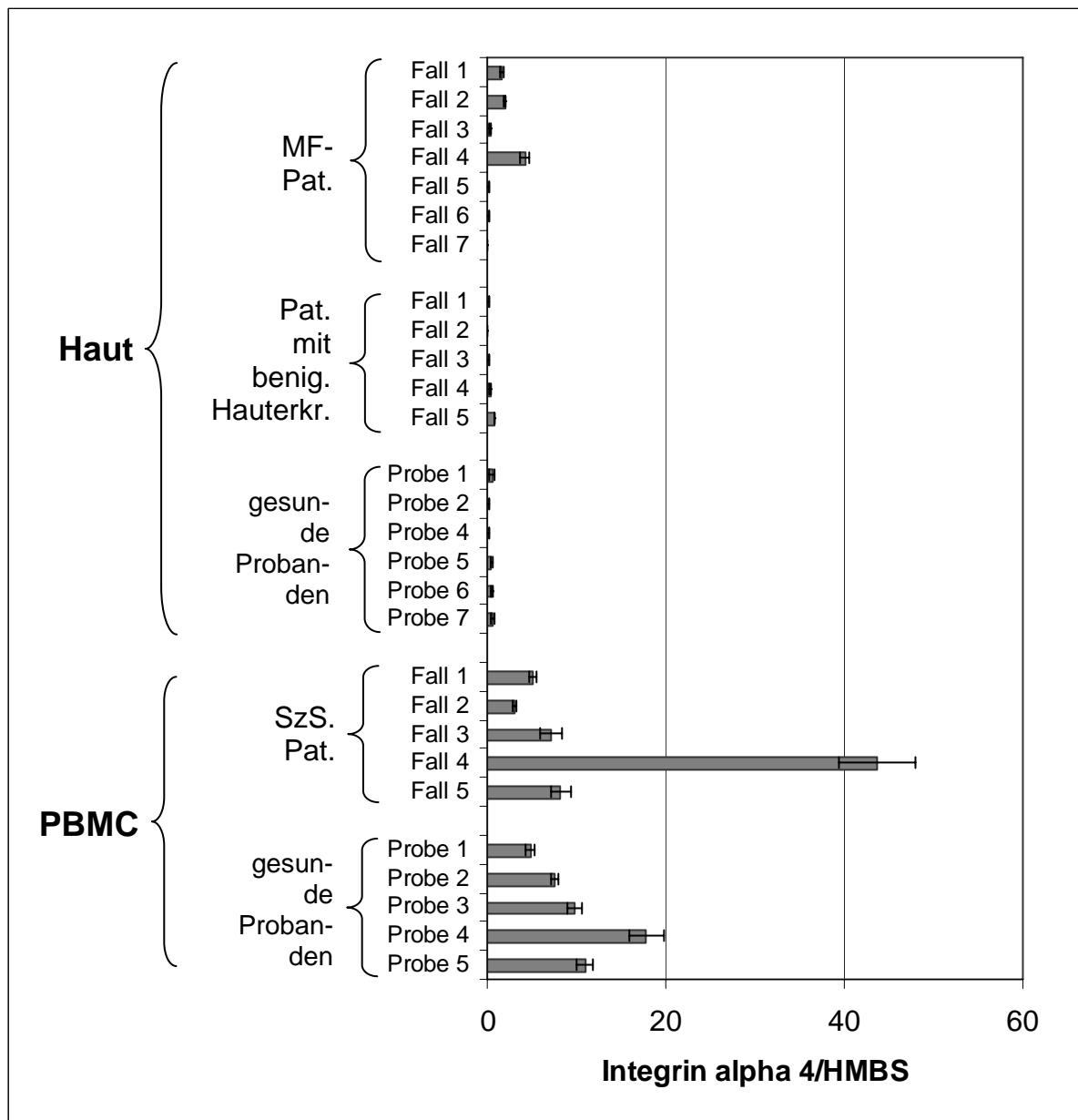
Auf der Y-Achse des Diagramms von Abbildung 16 sind die einzelnen Proben und auf der X-Achse ist die Expression von MT5-MMP in Relation zu HMBS angegeben: Zum Beispiel enthält die PBMC-Probe 5 der gesunden Probanden (letzte Probe des Diagramms) 15fach mehr MT5-MMP- als HMBS-Kopien. Für die Hautproben der Mycosis fungoides-Patienten (MF Pat.) weist das Diagramm eine Erniedrigung im Vergleich zu denen der gesunden Probanden auf. Im Gegensatz dazu haben drei PBMC-Proben von Sézary Syndrom-Patienten (SzS Pat.) etwas höhere Werte und zwei niedrigere Werte als die PBMC-Proben gesunder Probanden, so dass hier keine Aussage getroffen werden kann.



**Abbildung 16: Transkriptionshöhe von MT5-MMP bei CTCL.** In der Analyse wurden 5 Gruppen analysiert. Hautproben von Mycosis fungoides-Patienten wurden mit denen von Patienten mit benignen Hauterkrankungen und denen von gesunden Probanden verglichen. Zusätzlich wurden PBMC-Proben von Sézary Syndrom-Patienten und von gesunden Probanden untersucht. Im Hautvergleich zeigen Mycosis fungoides-Patientenproben im Vergleich zu Proben gesunder Probanden eine Erniedrigung.

## Die Transkriptionshöhe von Integrin $\alpha 4$ ist bei Sézary Syndrom Patienten nicht erhöht.

In Abbildung 17 sind die ermittelten Quotienten von Integrin  $\alpha 4$  dargestellt, das in denselben Haut- und PBMC-Proben untersucht worden war. Im Gegensatz zu gesunden Probanden und Patienten mit benignen Hauterkrankungen ist in der Haut von drei MF-Fällen eine messbare Expression zu sehen. Die PBMC-Proben der SzS-Patienten weisen mit einem Ausre   er (Fall 4) im Vergleich zu den PBMC-Proben der gesunden Probanden gleiche oder tendenziell niedrigere Werte auf.

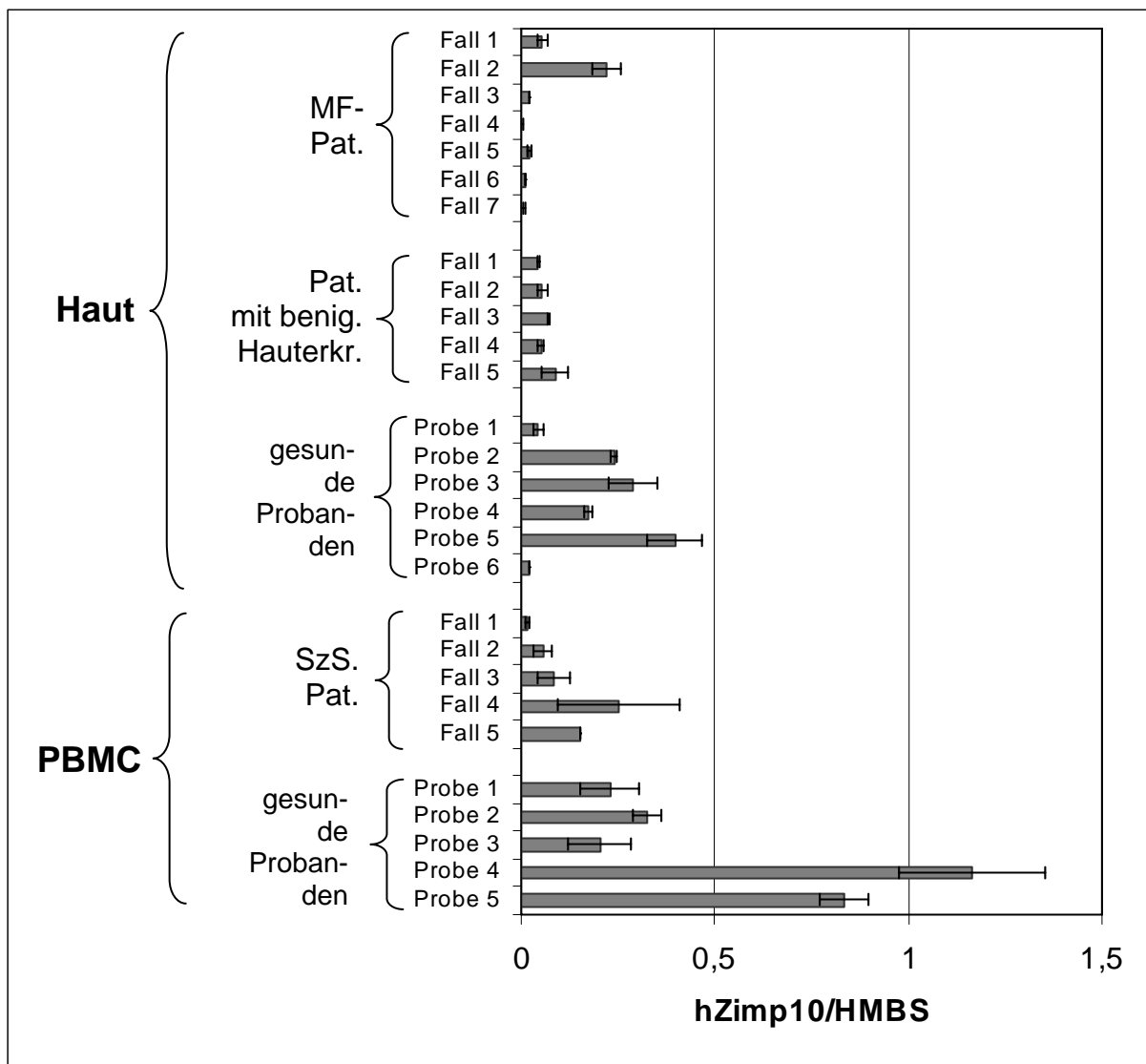


**Abbildung 17: Transkriptionshöhe von Integrin  $\alpha 4$  bei CTCL.** Die gleichen Proben wie in Abbildung 16 wurden hier auf Integrin  $\alpha 4$  untersucht. Im Vergleich zu Patienten mit benignen Hauterkrankungen und zu gesunden Probanden ist in drei Hautproben von MF-Patienten eine Expression zu sehen. Bis auf einen Ausre   er (Fall 4) zeigen die PBMC-Proben der SzS-Patienten gleiche oder tendenziell niedrigere Werte als die der gesunden Probanden.

## Die Transkriptionshöhe von hZimp10 ist bei CTCL-Patienten erniedrigt.

Die abgeleiteten Transkriptzahlen des Nicht-Plasmamembranproteins hZimp10 (human zinc finger-containing, Miz1, PIAS-like protein of chromosome 10) unterscheiden sich erheblich von denen von MT5-MMP und Integrin  $\alpha 4$ , was an der X-Achse des Diagramms in Abbildung 18 deutlich wird (s. auch Rohdaten im Anhang). Sie lagen nämlich unter denen von HMBS, so dass fast alle Quotienten unter 1 liegen.

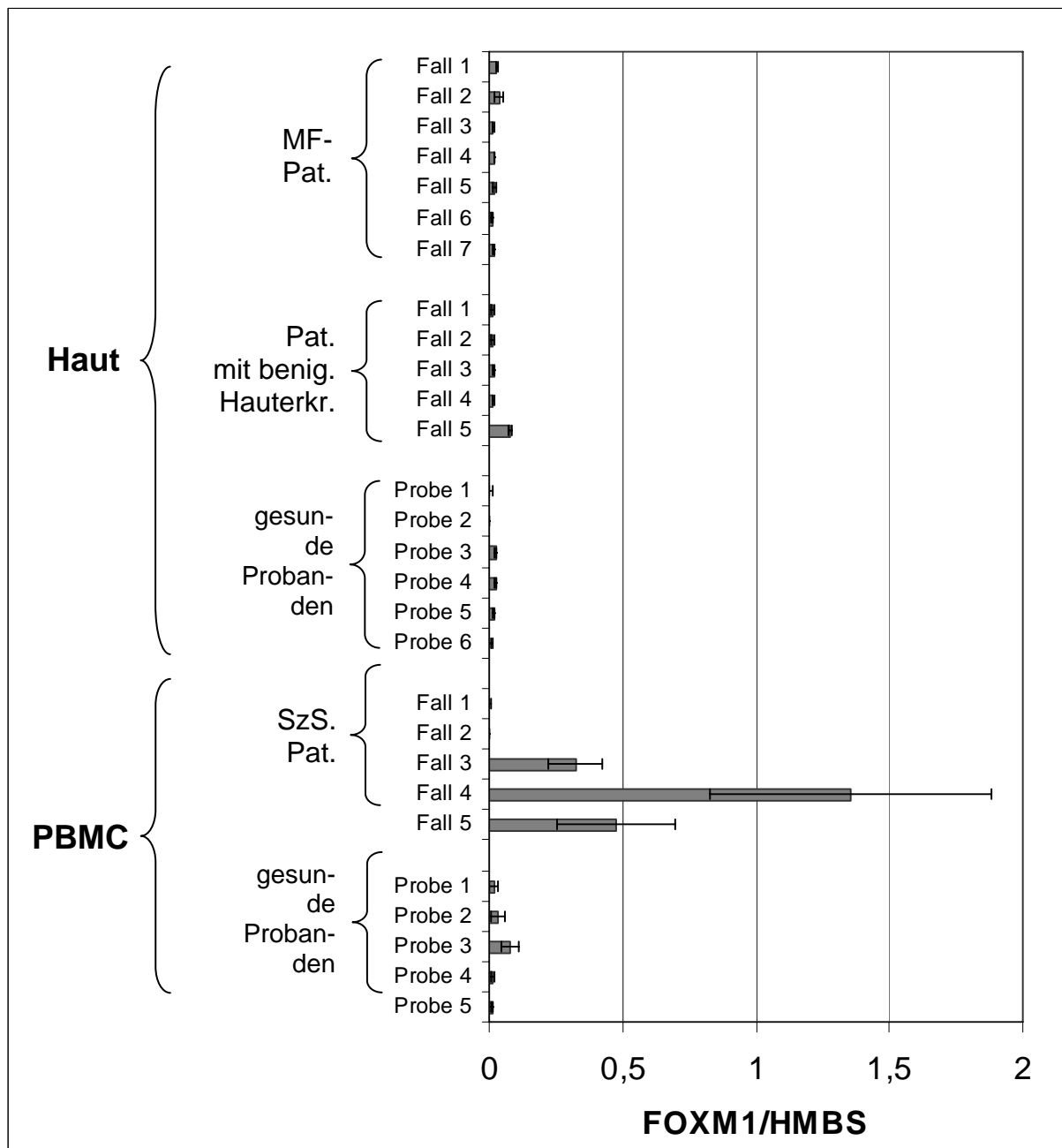
Das Diagramm zeigt im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten mit benignen Hauterkrankungen nur für zwei MF-Fälle eine Expression von hZimp10 und daher eine Erniedrigung zu gesunden Probanden und Patienten mit benignen Hauterkrankungen. Auch im PBMC-Vergleich zeigen die SzS-Patientenproben eine tendenziell niedrigere Expression als die Proben gesunder Probanden.



**Abbildung 18: Transkriptionshöhe von hZimp10 bei CTCL.** Die CTCL-Proben (MF Pat. und SzS Pat.) weisen im Vergleich den gesunden Kontrollgruppen eine niedrigere oder teilweise fehlende Expression von hZimp10 auf.

# **In drei Sézary Syndrom Patienten wurde eine FOXM1-Expression gemessen.**

Als letztes wurde der Transkriptionsfaktor FOXM1 analysiert. Auch hier lagen viele ermittelten Transkriptmengen so weit unter denen des Referenzgens HMBS, dass auf eine fehlende Expression geschlossen werden kann. Mit der Darstellung in Abbildung 19 wird weiter veranschaulicht, dass im Vergleich zu den übrigen Proben eine FOXM1-Expression in drei PBMC-Proben von Sézary Syndrom Patienten erfasst wurde.



**Abbildung 19: Transkriptionshöhe von FOXM1 bei CTCL.** Im Vergleich zu den übrigen Proben kann in drei PBMC-Proben von Sézary Syndrom Patienten eine Expression von FOXM1 beobachtet werden.

### **3.8. Das Plasmamembranprotein MT5-MMP weist beim kutanen T-Zell Lymphom ein von Normalzellen abweichendes Reifungsmuster auf**

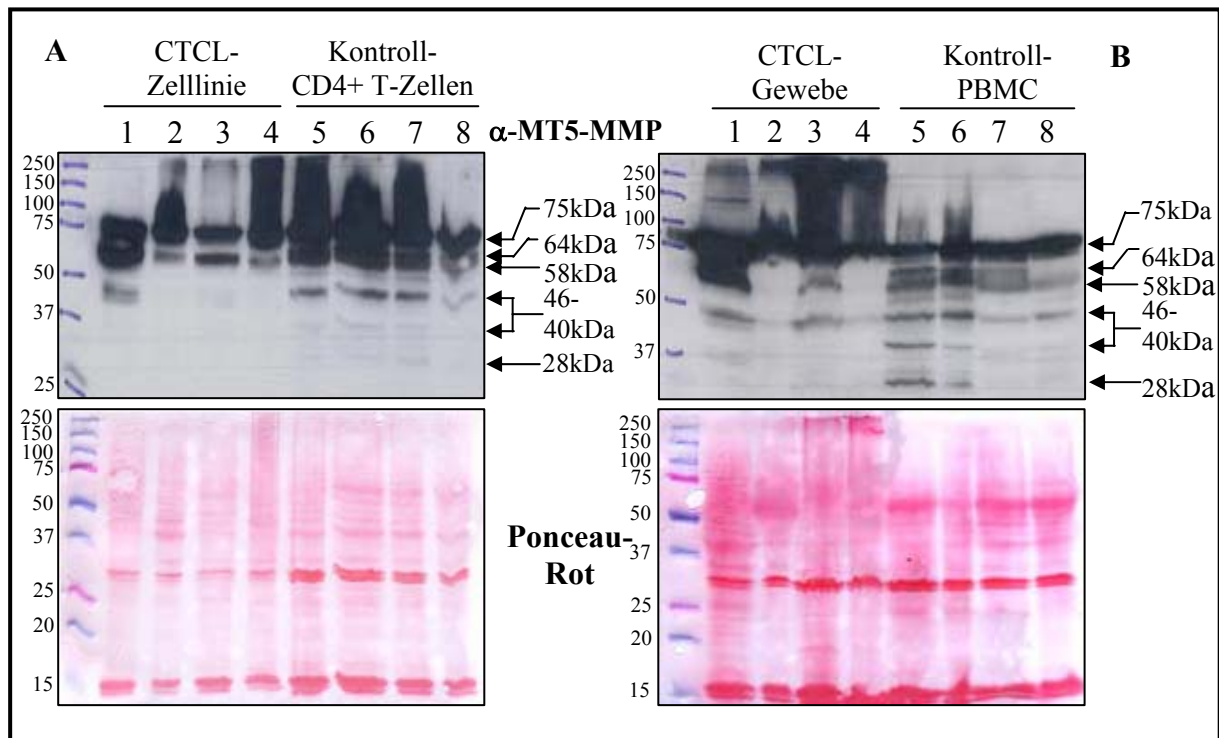
Nachdem Real-time PCR Analysen im Vergleich zu gesunden Probanden erniedrigte Transkriptmengen von MT5-MMP in Hautproben von MF-Patienten zeigen konnten, sollte in den folgenden Analysen auch ein möglicher Unterschied im Reifungsmuster von MT5-MMP untersucht werden. Es ist bekannt, dass das Protein nach seiner Translation weiter prozessiert wird, so dass letztlich mehrere Formen in und außerhalb der Zelle vorliegen.

Das frühe Translationsprodukt von MT5-MMP besteht wie die membranständigen Mitglieder MT1-, MT2- und MT3-MMP N-terminal aus einer Signalsequenz (Prädomäne) und einer Prodomäne, die bei der Aktivierung abgespalten wird. Anschließend folgt über eine Furin-ähnlichen Spaltungsstelle die katalytische Domäne, die wiederum über eine kurze Hinge-Region mit einer für die Substraterkennung wichtigen Hämopexin-ähnlichen Domäne verbunden ist. An sie ist ein kurzer Stamm angehängt. Gefolgt wird er von der kurzen Transmembrandomäne. Eine kleine zytosolische Domäne bildet den C-Terminus des Proteins. Für die Abspaltung der Prodomäne und somit die Aktivierung von MT5-MMP sorgen Proteinasen im Golgi-Apparat (Folgueras et al., 2004). Zusätzlich werden MT5-MMP-Proteine teilweise auch von der Transmembran- und der zytosolischen Domäne posttranslationell abgespalten und als lösliche Formen sezerniert (Pei, 1999). Diese haben eine Größe von 40 und 46kDa. Desweiteren wird ein Teil der MT5-MMP-Proteine im Trans-Golgi-Netzwerk von Furin-Typ Konvertasen weiter gespalten, so dass eine 28kDa große Form entsteht. Es handelt sich hierbei um die katalytische Domäne, die als eine lösliche Form sezerniert wird und unabhängig von der Zelloberfläche als Proteinase aktiv ist. Alle Formen werden innerhalb der Zelle produziert und auch die Aktivierung erfolgt im Zellinneren.

Somit existiert MT5-MMP in mindestens vier verschiedenen Formen: Zum einen als inaktives Zymogen mit einer Größe von 64kDa, als aktivierte membranständige Form mit einer Größe von 58kDa, als lösliche Form mit einer Größe von 40 und 46kDa und als abgespaltene, lösliche katalytische Domäne mit einer Größe von 28kDa.

Um die einzelnen Formen und ihre Zusammensetzung beim kutanen T-Zell Lymphom zu analysieren, wurden Zelllysate der vier CTCL-Zelllinien SeAx, HH, Cou-L3 und HuT78 und eine Kontrollgruppe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die aus peripheren Blutmonozyten vier gesunder Personen mit Microbeads isoliert wurden, auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen (Abbildung 20A). Zum anderen wurden periphere Blutmonozyten von Sézary Syndrom-Patienten und eine Hautprobe eines Mycosis fungoides-Patienten mit peripheren

Blutmonozyten vier gesunder Probanden verglichen und ebenfalls auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. (Abbildung 20B).



**Abbildung 20: Das von Normalzellen abweichende Reifungsmuster von MT5-MMP bei CTCL**  
 Für die Analyse wurden Zelllysate aufgetragen. Die Ponceau-Färbung und der Western Blot mit einem MT5-MMP Antikörper wurden mit demselben Blot durchgeführt. Der Vergleich von CTCL-Zelllinien mit isolierten CD4+ T-Zellen gesunder Probanden (A), sowie PBMC von SzS-Patienten und einer Hautprobe eines MF-Patienten mit PBMC gesunder Probanden (B) zeigt, dass die aktiven löslichen MT5-MMP Formen (46, 40 und 28kDa) in CTCL Proben unterrepräsentiert sind. Aber auch die membranständigen Formen, besonders das Zymogen (64kDa), sind bei CTCL weniger vertreten.  
 A: 1: SeAx, 2: HH, 3: Cou-L3, 4: HuT78, 5-8: CD4+ T-Zellen gesunder Probanden (je 20µg)  
 B: 1: MF Pat.-Haut, 2-4: SzS Pat.-PBMC, 5-8: PBMC gesunder Probanden (je 40µg)

Als Kontrolle für den gleichmäßigen Gesamt-Proteinauftrag der Proben wurden nach Transfer auf Nitrocellulosemembran Ponceau-Färbungen der Blots verwendet. In der obigen Abbildung sind die Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen MT5-MMP und die Ponceau-Färbungen beider Vergleiche dargestellt. Der eingesetzte polyklonale Antikörper reagiert gegen die katalytische, Hinge und Hämoexin-ähnliche Domäne. Da in allen Formen von MT5-MMP zumindest eine dieser Domänen enthalten ist, bindet dieser Antikörper an alle Formen von MT5-MMP.

In Spur 5 der Abbildung 20B sind unterhalb der markanten Bande bei 75kDa alle oben angesprochenen MT5-MMP Formen (64, 58, 40-46 und 28kDa) zu sehen. Die auf der Höhe von 75kDa sichtbare Bande ist in allen Spuren zu sehen. Sie könnte die in der Literatur angesprochene glykosylierte Form sein, deren Aktivierungszustand allerdings nicht näher beschrieben ist (Pei, 1999).

Auf dem in Abbildung 20A dargestellten Blot liegen die Banden der Proform (64kDa) und die der aktiven membranständigen Form (58kDa) sehr eng zusammen. Zusätzlich sieht es in diesem Vergleich so aus, als gäbe es keine Proform in den Spuren der Zelllinien. Desweiteren zeigen zwei der CTCL-Zelllinien, HuT78 und HH, bei relativ gleichmäßiger Proteinbeladung (s. Ponceau-Färbung) eine geringere Menge der aktiven Form bei 58kDa als die gesunden CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Am offensichtlichsten ist aber, dass nur bei den Zelllinien SeAx und ganz schwach bei Cou-L3 die lösliche Form bei 46kDa schwach erkannt wurde, wohingegen aber bei keiner der CTCL-Zelllinien die löslichen Formen bei 40kDa und bei 28kDa zu sehen sind. Die glykosylierte Form bei 75kDa dagegen ist anscheinend in allen Spuren in etwas gleicher Menge vertreten.

In Abbildung 20B zeigt der Vergleich von PBMC-Proben von Sézary Syndrom-Patienten und einer Hautprobe eines MF-Patienten mit PBMC-Proben gesunder Probanden das gleiche Bild. Allerdings ist hier ein schwaches Ungleichgewicht der Bande bei 75kDa zugunsten der CTCL-Patientenproben zu sehen. Offensichtlich fehlen bei allen Patientenproben außer bei der Hautprobe des MF-Patienten die Proform und bei zwei Proben sogar zusätzlich die aktive membranständige Form bei 58kDa. Ferner sind auch hier die löslichen Formen bei 40kDa und 46kDa bei den Patientenproben weniger stark vertreten als in den PBMC-Proben gesunder Probanden. Nur zwei Proben (Spur 1 und 3) weisen eine sichtbare Bande bei 46kDa auf. Die lösliche aktive katalytische Domäne fehlt hier ebenfalls komplett in allen CTCL-Patientenproben.

Zusammengefasst konnten hier in der Reifung des MT5-MMP Translationsproduktes im Vergleich zu den Kontrollgruppen niedrigere Mengen der membranständigen Proform und vor allem der löslichen Formen bei den CTCL-Proben gezeigt werden. Bei vielen Proben fehlten sogar einige Formen gänzlich. Hingegen war die als glykosyliert beschriebene Form bei 75kDa in allen Proben vertreten. Obwohl die Reifungsmuster zwischen den Patienten stark voneinander abweichen, konnte gezeigt werden, dass das MT5-MMP Protein beim kutanen T-Zell Lymphom insofern ein von Normalzellen abweichendes Reifungsmuster besitzt, als ihm durchgängig die beiden löslichen Formen von 40kDa und 28kDa fehlen.



## 4. DISKUSSION

### 4.1. Die Verwendung reaktiver Kaninchenserum gegen ein CTCL-Oberflächenpräparat in der Suche nach tumorspezifischen Proteinen

Die Suche nach Proteinen mit Tumorspezifität, sei es ihre Überexpression im Tumor oder ihre Modifizierung, ist von großem Interesse für die Etablierung neuer immuntherapeutischer Ansätze. Speziell Oberflächenproteine, die sich als tumorspezifisch erweisen, stehen im Fokus von therapeutischen Antikörpertherapien. Beispiele für bereits etablierte Antikörpertherapien für Tumore wie Brustkrebs wurden in der Einleitung vorgestellt. Aber nicht nur für die Bekämpfung, sondern auch für die Aufklärung der Entstehung und Progression von Tumoren können tumorspezifische Plasmamembranproteine nützlich sein.

Die Identifizierung solcher Proteine des kutanen T-Zell Lymphoms war das Ziel dieser Arbeit. Dafür wurde zunächst mit einer Plasmamembran-Anreicherung ein Oberflächenpräparat einer kutanen T-Zell Lymphomlinie hergestellt. Ziel war es dabei ein Proteingemisch zu gewinnen, das das Spektrum aller auf der Zelloberfläche vorhandenen Proteine beinhaltet und schließlich zur Immunisierung zweier Kaninchen dienen sollte.

Western Blot Analysen des gewonnenen Oberflächenpräparats zeigten deutlich, dass mit der modifizierten Aufreinigungsmethode nach Ellis et al. (1992) Plasmamembranproteine angereichert werden konnten. Allerdings zeigten sie auch, dass das Präparat auch geringe Mengen an Proteinen anderer Zellkomponenten wie des Endoplasmatischen Retikulums enthielt. Da die Membran des endoplasmatischen Retikulums ähnlich aufgebaut ist wie die Plasmamembran, war es schwierig diese auszuschließen. Der Nachweis von  $\beta$ -Actin zeigte zusätzlich wenn auch schwach, dass auch teilweise noch das Zytoskelett mitverschleppt wurde.

Dennoch war das mechanische Aufbrechen der Zellen mit einem Dounce Homogenisator und die Anreicherung mit differentiellen Zentrifugationsschritten die schonendste und auch effizienteste Vorgehensweise um ausreichende Mengen an Plasmamembran für die nachfolgende Immunisierung von Kaninchen zu gewinnen. Für ein effektives Aufbrechen werden zwar oftmals Zellen beschallt, doch hat das zur Folge, dass die Organellen zerstört werden, was eine Aufreinigung mit differentiellen Zentrifugationen erschweren würde. Auch die häufig zur Plasmamembran-Isolierung verwendete Biotinylierungsmethode hätte hier nicht eingesetzt werden können, da in der nachfolgenden Immunisierung die Kaninchen sonst

mit größter Wahrscheinlichkeit hohe Mengen an Anti-Biotin und auch Anti-Avidin Antikörper generiert hätten, die im weiteren Verlauf störend gewesen wären.

Nach der Immunisierung des ersten Kaninchens wurde mithilfe einer ELISA-Analyse der Titer der gewonnenen Antiseren getestet. Die Ergebnisse zeigten eine eindeutige Reaktion gegen das zur Immunisierung verwendete Oberflächenpräparat. Ferner konnte man auch sehen, dass die Boostreaktionen keine weitere Steigerung der Gesamtreaktion gegen das Präparat erzeugten, so dass nur noch zwei Boostreaktionen für die Immunisierung des zweiten Kaninchens durchgeführt wurden. Zusätzlich wurde auch untersucht, ob die gewonnenen Antiseren Proteine des Präparats im denaturierten Zustand erkennen. Auch hier konnte eine eindeutige spezifische Reaktion der Post-Immunseren im Vergleich zu den Prä-Immunseren beobachtet werden. Mit einer immunzytochemischen Analyse konnte desweiteren beobachtet werden, dass die Antiseren auch mit der Zelloberfläche ganzer HuT78-Zellen reagierten.

Zusammengefasst zeigten alle Tests, dass die gewonnenen Kaninchen-Antiseren eine spezifische Reaktivität Proteine der verwendeten kutanen T-Zell Lymphomlinie HuT78 besaßen, die bei der nachfolgenden Immunpräzipitation und auch bei der serologischen Analyse einer cDNA-Phagenbank einer weiteren kutanen T-Zell Lymphomlinie, SeAx, ausgenutzt werden konnte, um nach Plasmamembranproteinen zu suchen, die in späteren Analysen auf ihre Expression bei CTCL untersucht wurden.

Trotz der Voranalysen waren noch einige Fragen über die Zusammensetzung der Antikörper in den Kaninchenseren ungeklärt, die allerdings mit Identifizierung ihrer Antigene in den folgenden Analysen beantwortet werden sollten:

- 1) Die Reaktivitätstests zeigten, dass die Kaninchenseren gegen Oberflächenproteine der Zelllinie reagierten. Würden die Antikörper-Mengen hoch genug sein, um die relativ hohe Detektionsgrenze in der Immunpräzipitation zu überschreiten?
- 2) Eine andere Frage, die hier aufkommt ist die der Antigenität. Besaßen Plasmamembranproteine des Oberflächenpräparats eine ausreichende um humorale Immunantworten im Kaninchen auslösen zu können?
- 3) Bekanntermaßen besitzen die meisten plasmamembranständigen Proteine viele Glykosyl-, Phosphat- oder auch Sulfatreste. Vorallem Glykosylierungen sind die wichtigsten posttranslationellen Modifikationen und geben jedem plasmamembranständigen Protein ein zusätzliches individuelles Profil. Diese Reste können allerdings große Teile oder sogar die komplette Peptidsequenz maskieren, so dass Antikörper gegen bestimmte Peptidsequenzen nicht erzeugt werden. Reichte

dennoch die Menge an generierten Anti-Peptid-Antikörper aus um in der serologischen Analyse der Phagenbank einige zu identifizieren?

- 4) im Gegensatz zu SEREX-Analyse bezieht die Immunpräzipitation Antikörper gegen modifiziertes Protein mit ein. Würde die Menge ausreichen um Plasmamembranproteine präzipitieren zu können?

## **4.2. Immunpräzipitation als erste Möglichkeit für die Identifizierung von Proteinen, gegen die die Kaninchenserum reaktiv sind**

Immunpräzipitationen haben oft das Ziel einzelne Proteine oder Bindungspartner bestimmter Proteine (Ko-Immunpräzipitation) zu identifizieren. In der hier durchgeführten Immunpräzipitation hingegen sollten aus dem Proteingemisch des Oberflächenpräparats alle Proteine identifiziert werden, die von Antikörpern der Kaninchen-Antiseren erkannt worden waren. Anders als mit der serologischen Analyse einer cDNA-Phagenbank sollten bei der Immunpräzipitation auch posttranslationell modifizierte Proteine miteinbezogen werden.

Antikörper der gewonnenen Kaninchenserum wurden zunächst mit Protein A-Agarose Beads gekoppelt und schließlich mit einem HuT78-Oberflächenpräparat inkubiert. Präzipitierte Proteine wurden von den Antikörpern getrennt (Elution) und für ihre Identifizierung elektrophoretisch aufgetrennt. Banden, die im Vergleich zur Immunpräzipitation mit dem Prä-Immunserum nicht auftauchten, wurden ausgeschnitten und über die massenspektrometrischen Analysen MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) und ESI-MS/MS (Electrospray ionization-mass spectrometry) identifiziert.

Der Grund für eine kolloidale Coomassiefärbung der SDS-Polyacrylamidgele liegt in der Tatsache, dass kolloidales Coomassie (CBB-G250) im Gegensatz zum Standard Coomassie Brilliant Blue R (30-100ng) mit 10ng eine deutlich höhere Sensitivität, im Vergleich zur Silberfärbung mit 1 bis 5ng aber eine etwas niedrigere besitzt. Allerdings ist die kolloidale Coomassiefärbung im Gegensatz zur Silberfärbung mit den obigen genannten massenspektrometrischen Messungen kompatibel. Die hier durchgeführten Messungen ergaben für die insgesamt 12 ausgeschnittenen Banden 17 verschiedene Proteine. Der Grund für die höhere Zahl der identifizierten Proteine ist, dass die Analyse ESI-MS/MS fähig ist, aus einem Proteingemisch mehrere und nicht nur das prominenteste Protein zu identifizieren.

Bei Betrachtung der einzelnen Proteine der Liste (Tabelle 6 in Kapitel 3.4.) wird sofort deutlich, dass es sich bei allen um sehr häufig in der Zelle vorkommende, intrazelluläre

Proteine handelt. Trotz der gewählten Färbung hatte die durchgeführte Immunpräzipitation offenbar Einschränkungen, die noch immer die Detektionsgrenze betreffen. Die Schwierigkeit Plasmamembranproteine zu präzipitieren und identifizieren, wurde zwar mit der Verwendung eines Plasmamembran-angereicherten Präparats verringert, allerdings scheint trotzdem der Anreicherungsgrad nicht ausgereicht zu haben. Eventuell wurden Plasmamembranproteine präzipitiert, doch war ihre Menge immer noch zu gering, um mit Coomassie im Gel sichtbar zu werden.

Nicht nur die Menge des Antigens, den Plasmamembranproteinen der Zelllinie, sondern auch die Menge der gegen sie gerichteten Antikörper scheint ein limitierender Faktor gewesen zu sein. Offensichtlich lagen auch diese nicht ausreichend vor. Zusätzlich schien auch der Anteil an Antikörpern gegen posttranslationelle Modifikationen nicht sehr hoch gewesen zu sein, um ausreichend Proteine zu binden.

### **Einige der immunpräzipitierten Proteine haben vielseitige Funktionen, die auch bei Tumoren eine Rolle spielen**

Literaturrecherchen ergaben, dass viele immunpräzipitierte Proteine bei Tumoren eine Aufgabe haben können. Gerade ihr häufiges Vorkommen in der Zelle lässt weitere, als ihre bekannten Funktionen vermuten.

Unter den identifizierten Proteinen befand sich Cyclophilin A, ein in der Zelle sehr häufig vorkommendes Protein, das neben seiner Funktion als Chaperon auch als Inhibitor des pro-apoptotischen Bcl-2 Antagonisten des Zelltods (Bcl-2 antagonist of cell death, BAD) in aktivierten T-Zellen fungiert (Waldmeier et al., 2003). In Bezug auf das kutane T-Zell Lymphom ist diese anti-apoptotische Funktion von Cyclophilin A interessant, da viele Studien eine Ansammlung von Tumorzellen des CTCL in der Haut Ereignissen zusprechen, die eher anti-apoptotisch als proliferativ sind. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde unter anderem das anti-apoptotische Protein Bcl-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2) bei CTCL stark exprimiert gefunden (Dummer et al., 1995). Zusätzlich wurde Cyclophilin A über die Immunpräzipitation und über die SEREX-Analyse identifiziert. Dies zeigt, dass die gewonnenen Kaninchenserum die gleichen Antigene sowohl in einem prokaryontischen System wie der SEREX-Analyse als auch in einem *in vitro* System wie der Immunpräzipitation erkennen.

Aufgrund der für die Immunpräzipitation gewählten Bedingungen wurden auch mehrere Proteine bzw. Untereinheiten von Komplexen ko-immunpräzipitiert. Zum einen waren es vier

verschiedene Aminoacyl-tRNA-Synthetasen (ARS) des sogenannten ARS-Komplexes und zum anderen zwei Untereinheiten des TCP-1 enthaltenden Chaperonins (CCT).

Über die Funktion des ARS-Komplexes ist noch nicht viel bekannt. Indizien weisen auf eine kontrollierte und kompartmentalisierte Regulation der Translation hin. Die Komplexe sind bislang auf den Zellkern beschränkt, was neben einer Proteinsynthese im Kern noch auf weitere Aufgaben deuten könnte. Eines der Nicht-ARS-Mitglieder des Komplexes, p43, ist ein Zytokin und induziert die Synthese von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-8, Monozyten chemotaktisches Protein-1 (MCP-1), Makrophagen inflammatorisches Protein 1 (MIP-1), Interleukin-1 $\beta$  und auch ICAM-1 (Ko et al., 2001b). Einige Aminoacyl-tRNA Synthetasen des Komplexes selbst wurden in Interaktion mit anderen Faktoren als ihre zugehörigen tRNA-Molekülen gefunden. Die Methionin-tRNA-Synthetase verstärkt unter proliferativen Umständen die ribosomale RNA Synthese (Ko et al., 2000). Die identifizierte Glutaminyl-tRNA Synthetase inhibiert in Abhängigkeit der Glutamin-Konzentration die Apoptose Signal-regulierende Kinase-1 (ASK1) und wirkt anti-apoptotisch (Ko et al., 2001a).

Eine erhöhte Expression konnte für den zweiten identifizierten Komplex, das zytosolische Chaperonin containing TCP-1 (CCT), bei Tumoren wie dem hepatozellulären Karzinom und dem Kolonkarzinom beobachtet werden (Yokota et al., 2001), was unter anderem auch mit der allgemeinen Auffassung einer erhöhten Proteinsynthese in Tumorzellen einhergeht. Untersuchungen konnten neben seiner Rolle als Protein-Faltungshelfer weitere Funktionen des Chaperonins CCT feststellen. Eine Studie demonstrierte, dass es an den Tumorsuppressor von Hippel-Lindau, kurz VHL, bindet (Feldman et al., 1999). Dieser Tumorsuppressor ist Teil eines Komplexes, der für die Degradation von proliferativen Proteinen verantwortlich ist. Durch das Binden des Chaperonins CCT kann der Degradationskomplex nicht mehr gebildet werden, so dass folglich einige Zielproteine nicht abgebaut werden. Ein Beispiel für ein Zielprotein ist der Hypoxia-induzierbare Faktor-1, der als Aktivator eines pro-angiogenetischen Faktors bekannt ist (Maxwell et al., 1999). Kommt es nun zu einer Blockierung des von Hippel-Lindau Proteins und somit des Degradationskomplexes, kann es zu vermehrten Blutgefäßbildungen führen, was bei Tumoren eine verbesserte Versorgung des Tumorgewebes bedeutet.

Zusätzlich hat das von Hippel-Lindau Protein eine regulatorische Funktion bei der Elongation der RNA Polymerase II vermittelten Transkription. Auch hier würde eine ständige Aktivität Folgen in der Proteinsynthese haben. Spekulativ gesehen könnten vielleicht auch beim kutanen T-Zell Lymphom Proteine durch die Bindung des Chaperonins CCT an den

Tumorsuppressor von Hippel-Lindau nicht abgebaut worden sein, die onkogene Eigenschaften besitzen.

Ferner fand man heraus, dass viele Proteine über dasselbe Motiv mit dem Chaperonin CCT interagieren, das für die Interaktion zwischen CCT und das von Hippel-Lindau Protein verantwortlich ist (Valpuesta et al., 2002). Dass bei diesen Interaktionen CCT nicht als Chaperon arbeitet, kann aufgrund der Größen der jeweiligen Proteine ausgeschlossen werden, die zwischen 55 und 100kDa liegen. Diese Interaktionen müssen wie beim von Hippel-Lindau Protein an anderen Gründen liegen, die es noch zu untersuchen gilt. Es wäre interessant Proteine zu finden, die mit dem Chaperonin CCT interagieren und dabei eine tumorspezifische Rolle haben um ihre Expression bei CTCL zu untersuchen.

Über die Immunpräzipitation wurde auch das Vorläuferprotein des plasmamembranständigen interzellulären Adhäsionsmoleküls-1 (ICAM-1), identifiziert. Die Expression von ICAM-1 wird vor allem durch inflammatorische Zytokine induziert (Roebuck and Finnegan, 1999). Daher ist es nicht verwunderlich, dass ICAM-1 auch auf CTCL-Zellen exprimiert wird, da sie klonal von aktivierten T-Zellen stammen. Allerdings hat man bislang keine Überexpression im CTCL entdecken können. Eher konnte in einer Studie in einem CTCL-Fall eine erniedrigte Expression von ICAM-1 beobachtet werden, was Miyazawa et al. (1995) als Grund für den Verlust von Epidermotropismus betrachteten. Desweiteren konnte sogar ein zytokinabhängiges Ablösen von ICAM-1 von der Oberfläche von CTCL-Zellen nachgewiesen werden. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass solche Tumorzellen eventuell in Immuntherapie-Ansätzen weniger angreifbar sein könnten (Dummer et al., 1994). Aufgrund dieser Gegebenheit war das ICAM-1 wie alle übrigen präzipitierten und identifizierten Proteine als Kandidat für weitere Analysen daher nicht von Interesse.

Auch wenn die Immunpräzipitation Antikörper gegen Nicht-Protein-Epitope wie zum Beispiel Zucker-Reste einbezieht, konnte lediglich nur der Vorläufer eines Plasmamembranproteins identifiziert werden, der noch im Zellinneren lokalisiert ist. Somit scheint die Immunpräzipitation, zumindest so wie sie hier durchgeführt wurde, für die Suche nach Plasmamembranproteinen nicht effizient zu sein.

Es stellt sich die Frage, ob die Effizienz durch weitere Modifikationen verbessert werden könnte. Es wäre möglicherweise von Vorteil Immunpräzipitate mehrerer Durchgänge zu vereinen und stark konzentriert aufzutragen, um eine Visualisierung der selteneren Oberflächenproteine zu erreichen. Zudem sollte ihre Identifizierung nur mit der massenspektrometrischen Analyse ESI-MS/MS erzielt werden, die wie bereits erwähnt,

mehrere und somit auch weniger konzentrierte Proteine aus einem Gemisch unterscheiden kann.

### **4.3. Serologische Analyse einer cDNA-Bank als zweite Möglichkeit für die Identifizierung von Proteinen**

Außer der Immunpräzipitation wurde für die Suche nach Plasmamembranproteinen die serologische Analyse einer cDNA Phagenbank mit den Kaninchen-Antiseren durchgeführt. Ihr Vorteil liegt vor allem in der niedrigeren Antikörpermenge, die für eine positive Reaktion erforderlich ist. Die SEREX-Methode (Serological identification of antigens by recombinant expression cloning) wurde ursprünglich als Suche nach beliebigen, immunogenen Tumorproteinen etabliert, die eine humorale Antwort in Patienten hervorrufen (Sahin et al., 1995). Die Identifizierung solcher Proteine wurde dabei durch Reaktionen mit Seren von Patienten erreicht.

In der hier durchgeführten SEREX-Analyse wurden anstatt humaner Patientenseren zum ersten Mal Kaninchenseren für die serologische Suche nach Tumorantigenen eingesetzt. Mit ihnen wurde eine cDNA Phagenbank der kutanen T-Zell Lymphomlinie SeAx analysiert. Die Methode berücksichtigt im Gegensatz zur Immunpräzipitation nur Antikörper gegen Protein-Epitope, da die Proteine rekombinant in einem prokaryontischen System exprimiert werden. Aufgrund der fehlenden posttranslationellen Maschinerie in den Bakterien werden translatierte Proteine nämlich „nackt“ und ohne Modifikationen exprimiert, so dass hier nur Antikörper gegen Peptidsequenzen ihre Zielstrukturen finden können. Daraus musste schließlich auch die Konsequenz gezogen werden, dass zum Beispiel sehr stark glykosylierte Plasmamembranproteine kaum identifiziert werden können. Wie bereits diskutiert, werden plasmamembranständige Proteine im Unterschied zu denen des Zellinneren verstärkt glykosyliert oder anderweitig modifiziert. Allerdings stellt sich aber nach den Immunpräzipitations-Ergebnissen auch die Frage, ob tatsächlich so viele Antikörper gegen Nicht-Protein-Epitope in den generierten Kaninchenseren existieren.

Neben der Zusammensetzung der Kaninchenseren spielt auch die der verwendeten cDNA-Bank eine Rolle. Eventuell ist die mRNA-Menge für bestimmte Plasmamembranproteine niedriger als die anderer Proteine. Daher könnten zwar Antikörper gegen bestimmte Plasmamembranproteine existieren, doch aufgrund einer niedrigen cDNA-Menge sind ihre spezifischen Epitope in der SEREX-Analyse vielleicht sehr schwach oder auch gar nicht exprimiert.

Trotz alledem hat die SEREX-Analyse beispielsweise gegenüber Microarray-Analysen den Vorteil, dass auch komplett unbekannte Proteine bzw. cDNA-Stücke identifiziert werden können, die wiederum nicht in Array-Analysen erfasst werden. Desweiteren handelt es sich bei der SEREX-Analyse im Vergleich zur Immunpräzipitation um die eindeutig sensitivere Methode.

Betrachtet man die Liste der hier identifizierten Proteine (Tabelle 7 in Kapitel 3.5.) so fällt zunächst auf, dass die Liste viel länger ist. Mit 42 Proteinen wurden hier eindeutig mehr Kandidaten gefunden. Zudem fällt auch auf, dass hier trotz einiger Vorteile der Methode lediglich vier Proteine von den insgesamt 42 Proteinen in der Plasmamembran lokalisiert sind. Der Vergleich mit anderen SEREX-Analysen aus unserem Labor zeigt jedoch, dass sich das Verhältnis von Plasmamembranproteinen zu den anderweitig lokalisierten Proteinen verbessert hat.

### **Aus 42 identifizierten Proteinen wurden zwei Plasmamembran- und drei Nicht-Plasmamembranproteine für weitere Expressionsanalysen ausgesucht**

Unter den identifizierten Proteinen befinden sich viele Proteine, die in der Entstehung verschiedener Krebsarten entscheidend involviert sind. Sie waren daher sehr interessant für weitere Detailuntersuchungen, die einen Hinweis auf eine Rolle beim kutanen T-Zell Lymphom geben sollten.

Da in der Analyse insgesamt 42 verschiedene Proteine identifiziert worden waren, war es zunächst notwendig eine Auswahl zu treffen. Die Wahl wurde hauptsächlich durch Kriterien der Lokalisation und Funktion in Tumoren mit Literaturrecherchen entschieden und fiel auf die zwei Plasmamembranproteine MT5-MMP und Integrin  $\alpha 4$  und die drei Nicht-Plasmamembranproteine hZimp10, FOXM1 und Ku86.

### **Neue Lokalisation von Ku86 in der Plasmamembran von HuT78-Zellen**

Die Frage, warum das Transkript des eigentlich im Kern und Zytosol lokalisierten Ku86 in der SEREX-Analyse mit beiden Kaninchenseren in fast der Hälfte aller reaktiven Phagenklone inseriert war, führte zu folgenden Überlegungen: i) Eine starke Immunogenität von Ku86 könnte der Grund gewesen sein, dass die Kaninchen vermehrt Antikörper gegen Ku86 gebildet haben. Die daraus resultierende Frage wäre dann jedoch, warum Ku70 nicht ein einziges Mal detektiert wurde, das ebenfalls Teil des Ku-Autoantigens ist, ii) Da wie bereits erwähnt Ku86 zu den häufigen Proteinen in der Zelle zählt, könnte abgesehen von der



Frage der Stabilität der mRNA die cDNA-Molekülzahl von Ku86 in der Phagenbank sehr hoch sein. Folglich hätten dann aber auch andere wie zum Beispiel eines der häufigsten Proteine, Cyclophilin A, oder auch der Translations-Elongationsfaktor 1 $\alpha$  mehr als nur einmal detektiert werden müssen. iii) Möglicherweise ist Ku86 außer im Kern und im Zytosol auch auf der Zelloberfläche zu finden. Es wurden bereits für sehr viele Proteine eine zusätzliche Plasmamembran-Lokalisation festgestellt. Zwei solcher Proteine sind ebenfalls in der SEREX-Analyse identifiziert worden: Hsp70 und Calnexin.

Das Chaperon Hitzeschockprotein 70 (Hsp70) ist in nahezu allen Zellen und Zellkompartimenten exprimiert und wurde in der Plasmamembran von Tumorzellen gefunden (Ferrarini et al., 1992; Multhoff et al., 1995). Allerdings zeigte sich auch, dass Hsp70 auf der Zelloberfläche in der Tumorgenese nicht relevant zu sein scheint (Botzler et al., 1998).

Calnexin fungiert als ein Chaperon spezifisch im Endoplasmatischen Retikulum. Man fand auf Zellen wie unreifen Thymozyten, Mastrozytoma-Zellen, Fibroblasten und HeLa-Zellen Calnexin in ihrer Plasmamembran. Es wurde dabei festgestellt, dass es sich bei der Oberflächen-Expression um einen normalen Zyklus handelt (Wiest et al., 1995; Okazaki et al., 2000).

Studien hatten bei der Suche nach Adhäsionsmolekülen über CD40Liganden-Induktion Ku86 in der Plasmamembran von multiplen Myelomzellen entdeckt, das vermutlich aus dem Zytoplasma in die Plasmamembran migriert war. Zusätzlich wurde beobachtet, dass Ku86 bei der homo- und heterotypischen Aggregation eine förderliche Rolle spielt (Teoh et al., 1998). Später konnte mit einem Vergleich mit normalen tonsillären B-Zellen gezeigt werden, dass es sich bei der Translokation von Ku86 in die Plasmamembran um eine tumorspezifische Situation handelt. Eine CD40-Aktivierung bewirkte nur in den Myelomzellen eine Kolokalisation von Ku86 mit CD40 auf der Plasmamembran. Zusätzlich erwiesen sich die CD40-aktivierten Tumorzellen Apoptose-resistent, die durch Bestrahlung oder Doxorubicin induziert wurde. Antikörper gegen Ku86 stellten wiederum die Sensitivität für beide Behandlungen wieder her (Tai et al., 2002). Ferner zeigten weitere Studien, dass auch andere Tumorzellen von Leukämien oder von diversen soliden Tumoren im Vergleich zu normalen Zellen Ku86 in ihrer Plasmamembran exprimierten (Lynch et al., 2001). Eine Studie konnte sogar zeigen, dass Ku86 in der Plasmamembran von Brustkrebszellen das Metastasierungsverhalten dieser Zellen verstärkte (Ginis and Faller, 2000).

Ku86 in der Plasmamembran konnte genauer in den „Lipid rafts“ zugeordnet werden (Lucero et al., 2003). „Lipid rafts“ sind Detergenz-resistente, cholesterinreiche Subdomänen der

Plasmamembran, die auf der Außenmembran der Doppelschicht sitzen und deren Integrität für Signaltransduktionswege essentiell sind (Simons and Toomre, 2000).

Die Studien zur Lokalisation von Ku86 führten dazu, Ku86 auch in „Lipid rafts“ von Zellen des kutanen T-Zell Lymphoms (HuT78 Zellen) zu suchen. Als Vergleich wurden mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) einer gesunden Person gleichermaßen behandelt. Eine Berechtigung für diese Gegenüberstellung liegt in dem Befund der Studie über Ku86 in „Lipid rafts“ von Myelomzellen. Eine tumorspezifische Lokalisierung wird dort insofern festgestellt, als normale B-Zellen in ihren „Lipid rafts“ Ku86-negativ sind. Zusätzlich kann der Prozentsatz der Nicht-B- und T-Zelltypen (Monozyten und natürliche Killerzellen) im PBMC-Gemisch vernachlässigt werden, so dass eine Detektion von Ku86 in den Fraktionen der „Lipid rafts“ in der Analyse größtenteils den T-Zellen (CD4+ und CD8+) zugesprochen werden kann. Sie machen nämlich insgesamt ungefähr Dreiviertel der mononukleären Zellen des peripheren Bluts aus.

Eine Triton X-100 Behandlung bewirkte zunächst die Solubilisierung der Zellbestandteile bis auf den „Lipid rafts“. Aufgrund ihrer geringeren Dichte konnten schließlich aus dem oberen Bereich eines Sukrose-Dichtegradienten Fraktionen mit „Lipid rafts“ gewonnen werden. Über Western Blot Analysen der Gradienten-Fraktionen wurde Ku86 sowohl bei HuT78 Zellen als auch bei den Kontroll-PBMC auch in den Fraktionen der „Lipid rafts“ gefunden. Dabei unterschied sich das Verteilungsmuster zwischen beiden Proben dadurch, dass bei HuT78-Zellen Ku86 insgesamt stärker in den Fraktionen der Detergenz-löslichen Proteine exprimiert vorlag.

Der entscheidende Unterschied zwischen beiden Proben war die höhere Gesamt-Proteinmenge von Ku86 und auch die in den „Lipid rafts“ in HuT78 Zellen. Zudem bestand die Kontrollgruppe zwar auch aus Nicht-T-Zellen, doch lag auch der T-zellspezifische „Lipid raft“-Marker Lck in HuT78-Zellen höher exprimiert vor. Das könnte bedeuten, dass HuT78 Zellen eine erhöhte Zahl an „Lipid rafts“ auf ihrer Oberfläche haben. Zur Prüfung dieser Hypothese müssten weitere „Lipid raft“-Proteine wie Hedgehog oder auch Ras auf ihre Expression beim kutanen T-Zell Lymphom untersucht werden.

Zusammengefasst wird Ku86 bei HuT78 zum größeren Teil immer noch im Zellkern und Zytoplasma zu finden sein und dort seine bekannten und bereits genannten Rollen spielen ((s. Kapitel 3.5.) Doch weist seine neue Lokalisation in „Lipid rafts“ von CTCL-Zellen auf neue Funktionen hin. Theoretisch könnte Ku86 auch bei CTCL-Zellen die gleiche Rolle wie bei multiplen Myelomzellen spielen. CD40, das anscheinend für das Wandern und Verankerung

von Ku86 in die „Lipid rafts“ verantwortlich ist, wird nämlich auch von CTCL-Zellen exprimiert (Kamarashev et al., 1998; Storz et al., 2001; Bock and Gulbins, 2003). Somit könnte Ku86 auch beim kutanen T-Zell Lymphom in Signalwegen involviert sein, die vor Apoptose schützen.

### **Die membranständige Matrix Metalloproteinase 5 ist in CTCL-Zellen geringer aktiviert als in normalen Zellen.**

Als eines der vier plasmamembranständigen Proteine wurde MT5-MMP (membrane type 5 matrix metalloproteinase) während der SEREX-Analyse gefunden und zunächst mit Real-time PCR Analysen auf seine Expression im kutanen T-Zell Lymphom untersucht. Verglichen wurden dabei fünf Gruppen: Hautproben von Mycosis fungoides-Patienten, Hautproben von Patienten mit benignen Hautentzündungen, Hautproben von gesunden Probanden, PBMC-Proben von Sézary Syndrom-Patienten und PBMC-Proben von gesunden Probanden. Da jedoch die Anzahl der zur Verfügung stehenden CTCL-Patientenproben nicht sehr hoch war, sollte mit den Real-time PCR Analysen nur ein erster Hinweis auf seine Expression ermöglicht werden.

Matrix Metalloproteinasen vor allem die des membranständigen Typs werden einige aktive Rollen in der Tumorgenese zugeschrieben, da sie in der Prozessierung von Wachstumsfaktoren und anderen Oberflächenproteinen und besonders im Abbau der extrazellulären Matrix involviert sind, die in Kontext mit Tumorgenese entscheidende Ereignisse darstellen (Folgueras et al., 2004). MT1-MMP beispielsweise wurde in vielen Tumoren überexprimiert gefunden (Tsunezuka et al., 1996). Zusätzlich konnte eine Studie zeigen, dass allein die Transfektion von MT1-MMP Transkripten ausreichte um nicht-maligne Epithelialzellen zu invasiven Tumorzellen zu verwandeln (Soulie et al., 2005). MT5-MMP selbst wurde mit Northern Blot Analysen bei Gehirntumoren wie Glioblastomen oder Astrozytomen überexprimiert gefunden (Llano et al., 1999).

Mit Western Blot Analysen wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal MT5-MMP in peripheren Blutmonozyten und mit Real-time PCR Analysen zumindest auf Transkriptionsebene auch in der Haut nachgewiesen. Die Transkriptanalyse zeigte außerdem, dass im Gegensatz zu Gehirntumoren beim kutanen T-Zell Lymphom die Tumorproben im Vergleich zu Nicht-Tumorproben keine erhöhte Expression aufwiesen. Vielmehr scheint MT5-MMP in der Haut von Mycosis fungoides-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen erniedrigt zu sein.

Da MT5-MMP wie bereits erwähnt im Trans-Golgi Netzwerk aktiviert und auf dem Weg zur Zelloberfläche auch von seiner Transmembran- und zytosolischen Domäne gespalten werden kann, existieren auf Proteinebene mehrere Formen von MT5-MMP (Pei, 1999). Diese erst posttranslationell entstehenden Formen können in einer Real-Time PCR nicht einzeln erfasst werden, daher sollte eine Western Blot Analyse ermöglichen, Unterschiede auf Proteinebene zu detektieren. Die Ergebnisse zeigten im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht nur erniedrigte Mengen an aktiven Formen in den Patienten-Proben, sondern auch teilweise ein komplettes Fehlen vor allem an löslichen aktiven Formen. Der zusätzlich durchgeführte Vergleich von CTCL-Zelllinien mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen gesunder Personen zeigte das gleiche Ergebnis. Da es sich bei allen CTCL-Zelllinien bis auf Cou-L3 um CD4<sup>+</sup> T-Zellen handelt, ermöglichte er eine detailliertere Gegenüberstellung von Tumorzellen und Normalzellen.

Die Ergebnisse beider Analysen ergaben insgesamt, dass die Expression von MT5-MMP beim kutanen T-Zell Lymphom erniedrigt zu sein scheint, zusätzlich posttranslationell auch weniger prozessiert wird und daher auch weniger aktive Formen existieren. Nach den hier erhaltenen Ergebnissen spielt MT5-MMP in Lymphomen wie dem kutanen T-Zell Lymphom keine Rolle in der Tumorerbreitung. Da es sich bei den Zellen der lymphoiden Tumore um frei in den Gefäßen zirkulierende Zellen handelt, sind eventuell Matrix Metalloproteinasen wie MT5-MMP nicht essentiell um zu metastasieren.

### **Auch das zweite Plasmamembranprotein Integrin $\alpha 4$ ist bei CTCL nicht überexprimiert.**

Integrin  $\alpha 4$  war das zweite Plasmamembranprotein, das in der SEREX-Analyse gefunden und über Real-time PCR Analysen mit denselben Proben wie für MT5-MMP auf seine Transkriptionshöhe in kutanen T-Zell Lymphompatienten analysiert worden. In der Tumorgenese spielen Integrine gegensätzliche Rollen. Sie können inhibierend oder auch aktivierend in der Tumorbildung und Metastasierung wirken. Dies hängt vom Zelltyp und der Funktion des Integrin Rezeptors ab. In Adenokarzinomen des Kolons und der Brust konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von Integrin  $\alpha 2\beta 1$  zum Verlust von Tumordifferenzierung führen kann (Pignatelli et al., 1990; Zutter et al., 1990; Nigam et al., 1993). Desweiteren wurde Integrin  $\alpha V\beta 3$  in invasivem und metastasierendem Melanom hochreguliert gefunden (Albelda et al., 1990).

Die Studien über Integrin  $\alpha 4$  hingegen sprechen ihm eine inhibierende Rolle in Tumoren zu. In Burkitt Lymphomen wurde eine reduzierte Expression von Integrin  $\alpha 4\beta 1$  gefunden (Rincon

et al., 1992) und B16 Maus-Melanomzellen, die mit  $\alpha 4\beta 1$  Integrin transfiziert worden waren, wiesen eine reduziertes Invasionsverhalten auf. Weiter konnte mit *in vivo* Experimenten beobachtet werden, dass Integrin  $\alpha 4$  die Metastasenbildung supprimiert (Gossler et al., 1996). Eventuell könnte auch ein durch Integrin  $\alpha 4$  vermitteltes Signal zur Inhibition von MMP-Sekretion und so zu einer reduzierten zellulären Invasion beitragen (Huhtala et al., 1995).

Nach Madri et al. (1996) zeigten unter normalen Zuständen transmigrierte Lymphozyten, die aus den Blutgefäßen durch die Endothelschicht gewandert sind (Homing), eine Herunterregulierung von Integrin  $\alpha 4\beta 1$ . Auch in Gehirnschnitten von Mäusen konnte beobachtet werden, dass weiter gewanderte T-Zellen keine Integrin  $\alpha 4\beta 1$  Expression mehr aufwiesen, obwohl ihre CD4 Expression unverändert blieb.

In Bezug auf die Herunterregulierung von Integrin  $\alpha 4$  bei transmigrierten T-Zellen war es interessant, ob hier die Lymphomzellen, bei denen es sich um in die Haut gewanderte Zellen handelt, im Vergleich zu Zellen vor der Migration eine erniedrigte Integrin  $\alpha 4$  Expression aufweisen. Dafür wäre der Vergleich zwischen Lymphomzellen der Mycosis fungoides-Hautproben (transmigrierte Zellen) und den Lymphozyten der gesunden PBMC-Proben (Zellen vor der Migration) hilfreich. Er ist auch insofern legitim, da Proben von MF-Patienten ausgewählt wurden, die in den fortgeschrittenen Stadien IIB bis IV waren und deshalb eine hohe Tumorzelllast aufwiesen. Infolgedessen würden die hier erhaltenen Ergebnisse mit der beobachteten Herunterregulierung übereinstimmen, denn die gemessenen Werte der drei Integrin  $\alpha 4$ -positiven Hautproben von MF-Patienten sind deutlich niedriger als die der PBMC-Proben von gesunden Kontrollen. Zudem ist in den übrigen Hautproben von MF-Patienten trotz ihrer hohen Lymphomzellzahl wie in solchen von gesunden Probanden keine Expression von Integrin  $\alpha 4$  gemessen worden.

Der PBMC-Vergleich zwischen SzS-Patienten und gesunden Probanden zeigte, dass in den Lymphomzellen, die aus der Haut wieder in das periphere Blutsystem gelangen, die Expression von Integrin  $\alpha 4$  im Vergleich zu normalen Zellen nicht erhöht ist. Sie gelangen vermutlich wie ihre gesunden Pendanten ohne tumorspezifische Überexpression in ihre Metastasierungsorte wie Knochenmark, Leber und Milz.

Da die Tumorzellen des CTCL als chronisch aktivierte T-Zellen gehandelt werden, ist es ebenfalls interessant zu wissen, dass durch Bindung des Integrin  $\alpha 4$ -Interaktionspartners, das vaskuläre Zell-Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1), zusammen mit Anti-TCR/CD3 Antikörpern in chronisch stimulierten T-Zellen Apoptose auslöst (Damle et al., 1993). Mit dieser Erkenntnis könnte man annehmen, dass Integrin  $\alpha 4$  im kutanen T-Zell Lymphom nicht erhöht exprimiert ist um die Tumorzellen vor Apoptose zu schützen. Anders als eine Ku86-

Expression in der Plasmamembran würde bei Integrin  $\alpha 4$  vielmehr sein Fehlen auf der Plasmamembran die Tumorzellen vor dem programmierten Zelltod bewahren.

### **Das Nicht-Plasmamembranprotein hZimp10 ist in Tumorzellen des kutanen T-Zell Lymphoms scheinbar unterpräsentiert**

hZimp10 (human zinc finger-containing, Miz1, PIAS-like protein of chromosome 10) wurde als ein Nicht-Plasmamembranprotein aus der SEREX-Analyse ausgewählt und ebenfalls mit einer Real-time PCR Analyse in denselben Proben wie die beiden Plasmamembranproteine MT5-MMP und Integrin  $\alpha 4$  auf seine Transkription untersucht. Das relativ unbekannte hZimp10 wurde als ein Androgen-Rezeptor aktivierendes Protein entdeckt (Sharma et al., 2003). Es verfügt über die Zink-Finger Region Miz (Msx-interacting zinc finger, (Wu et al., 1997), die es mit den PIAS Proteinen teilt und daher auch als ein PIAS ähnliches Protein gesehen wird.

PIAS Proteine selbst wurden als spezifische Inhibitoren der STAT-vermittelten Transkriptionsaktivierung charakterisiert (Liu et al., 1998). Aus dieser Funktion ableitend entstand auch der Name PIAS für protein inhibitor of activated STAT. STAT Faktoren (signal transducer and activator of transcription) wiederum werden nach Zytokinbindung aktiviert und wandern in den Zellkern, wo sie die Transkription von Zytokin-regulierten Genen induzieren. PIAS Proteine verhindern als SUMO E3-Ligasen (small ubiquitin-like modifier) durch Sumoylierung die Bindung von STAT Transkriptionsfaktoren an die DNA. Bei der Sumoylierung wird anders als bei der ähnlichen Ubiquitylierung die Aktivität des Zielproteins modifiziert und nicht sein Abbau induziert. Ob hZimp10 selbst über eine SUMO E3-Ligaseaktivität verfügt, konnte bislang nicht festgestellt werden. Sicher ist jedoch, dass hZimp10 über die Miz-Domäne an den Androgen-Rezeptor bindet und anders als die PIAS Proteine über Sumoylierung nicht eine Inhibition sondern eine Aktivierung bewirkt (Sharma et al., 2003).

In der hier durchgeführten Expressionsanalyse wurde zum ersten Mal hZimp10 in der Haut nachgewiesen. Bislang war eine Expression im adultem Normalgewebe von Ovar, Prostata, Milz, Testis und schwach in peripheren Blutlymphozyten bekannt (Sharma et al., 2003). Außerdem zeigte die hier durchgeführte Analyse eine mögliche erniedrigte Expression in den kutanen T-Zell Lymphom Patientenproben im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Dieses Ergebnis deutet auf ein anderes Verhalten hin als in Prostatakrebszellen, in denen hZimp10 aktivierend auf einen onkogenen Faktor wirkt. Vielleicht kann hZimp10 wie PIAS-Proteine mit seiner Miz-Domäne an STAT-Transkriptionsfaktoren binden und sie inhibieren. Oder es

kann mit seiner noch unbekannten Sumoylierungsfähigkeit andere Proteine aktivieren, deren Charakter tumorsupprimierend ist. All diese Überlegungen wären eine mögliche Erklärung für die niedrigeren Werte der MF- und SzS-Patientenproben.

Für eine eindeutige Aussage müssten zunächst weitere Proben analysiert werden. Für den Nachweis einer inhibierenden Rolle von hZimp10 bei der Tumorentstehung wäre es außerdem von großem Interesse neue Interaktionspartner von hZimp10 zu finden. Wie hZimp10 in einem Yeast-Two-Hybrid System als Bindungspartner des Androgen-Rezeptor gefunden worden ist, könnte eine solche Suchanalyse für Bindungspartner für hZimp10 durchgeführt werden.

### **Das Mitglied des Shh-Signalweges FOXM1 wird scheinbar im Tumorgewebe von Sézary Syndrom-Patienten exprimiert.**

Als letztes Protein wurde das Nicht-Plasmamembranprotein FOXM1 (Forkhead Box M1) aus der SEREX-Analyse ausgewählt und auf seine Expression beim kutanen T-Zell Lymphom untersucht.

FOXM1 ist ein Mitglied des Sonic Hedgehog (Shh) Signalweges (Teh et al., 2002). Dieser Signalweg spielt eine Schlüsselrolle bei mehreren Tumoren wie Brust- und Prostatakrebs und auch Basalzellkarzinomen der Haut (Thayer et al., 2003; Kubo et al., 2004; Sheng et al., 2004). Durch die Bindung des Liganden Shh an seinen Rezeptor Patched (Ptch) kommt es zur Freilassung des Signalproteins Smoothed (Smo). Smo aktiviert den Glioma Transkriptionsfaktor-1 (Gli-1). Gli-1 führt schließlich zu einer erhöhten Transkription von FOXM1 (Teh et al., 2002). FOXM1 fungiert wiederum ebenfalls als Transkriptionsaktivator und ist ubiquitär in proliferierenden Zellen des embryonalen Gewebes exprimiert. In adultem, normalen Gewebe hingegen ist eine Expression bislang nur im Thymus, Dünndarm, Testis und den Ovarien gefunden worden (Ye et al., 1997). Zu seinen Zielgenen gehören Cyclin B, Cdc25B Phosphatase (Wang et al., 2002b), Aurora B Kinase, Polo-like Kinase (Krupczak-Hollis et al., 2004) und auch das Zentromer-assoziierte Protein F. Somit spielt FOXM1 eine wichtige Rolle im Zellzyklus beim G1/S- als auch G2/M-Übergang.

Desweiteren beschäftigte sich eine Vergleichsstudie mit der Suche nach überexprimierten Genen in soliden Tumorarten und entdeckte dabei, dass FOXM1 nahezu in allen untersuchten Tumorentitäten überexprimiert vorlag (Pilarsky et al., 2004). In der hier durchgeführten Real-time PCR Analyse wurde im Vergleich zu allen übrigen Proben eine Expression von FOXM1 bei drei von fünf SzS-Patientenproben beobachtet. Die Ergebnisse bestätigen die Aussagen

der Vergleichsstudie für das Sézary Syndrom. Dagegen trifft dies nicht für Mycosis fungoides zu.

Eventuell könnte eine Hochregulierung von FOXM1 bewirken, dass die Proliferationsrate der Tumorzellen des Sézary Syndroms gesteigert und so die Tumorzelllast im Gegensatz zu Mycosis fungoides so hoch wird, dass Tumorzellen aus „Platzgründen“ ins periphere Blut gelangen. Von dort aus erreichen sie andere Orte, an denen sie weiter proliferieren. Außerdem besteht auch eine Parallele zu dem Transkriptionsfaktor Twist, der ebenfalls mit Real-time PCR Analysen im Vergleich zu MF-Patienten in SzS-Patientenproben erhöht gefunden worden war (van Doorn et al., 2004). In Brustkrebs konnte eine Korrelation zwischen der Expression von Twist mit hochinvasivem, lobulärem Brustkrebs und eine aktive Rolle in der Metastasierung beobachtet werden (Yang et al., 2004). Vielleicht trägt FOXM1 in Tumorzellen des Sézary Syndroms dazu bei, dass sie Eigenschaften erlangen, die sie zu hochinvasiven Zellen verändern. Sie wären damit aggressiver als Tumorzellen der Mycosis fungoides.

Eventuell könnte FOXM1 als ein molekulardiagnostischer Marker für das Sézary Syndrom verwendet werden. Für eine Absicherung der Schlussfolgerung müssten auch hier weitere Proben von Sézary Syndrom- und Mycosis fungoides-Patienten auf ihre FOXM1 Expression untersucht werden um aussagekräftigere Resultate zu erzielen.

#### **4.4. Ausblick**

Kaninchen-Antiseren, die nach Immunisierung mit einem Oberflächenpräparat einer kutanen T-Zell Lymphom gewonnen wurden, fanden in dieser Arbeit bei der Suche nach Plasmamembranproteinen ihre Anwendung in der Immunpräzipitation und in der serologischen Analyse einer CTCL cDNA-Phagenbank. Immunpräzipitate enthielten ausschließlich intrazelluläre, abundante Proteine und nur ein Vorläuferprotein eines Plasmamembranproteins (ICAM-1). Dagegen konnten in der Phagenbank-Analyse vier reine Plasmamembranproteine (Ligatin, HLA-A, MT5-MMP und Integrin  $\alpha$ ) und Proteine mit einer nicht ausschließlichen Lokalisation in der Plasmamembran (Calnexin, Hsp70 und Ku86) identifiziert werden. Bei der in *E. coli* durchgeführten Analyse werden Antikörper gegen posttranslationell modifiziertes Protein nicht miteinbezogen. Ein kürzlich veröffentlichtes Hefe-Display System könnte hier das Spektrum erfassbarer cDNA-vermittelt exprimierter Plasmamembranproteine erweitern (Wadle et al., 2005).



Ferner könnten tumorspezifische Plasmamembranproteine über einen alternativen Weg zu der hier verwendeten Herangehensweise gefunden werden:

Zunächst werden überexprimierte oder auch konstitutiv aktivierte Zielproteine von Signalwegen wie Transkriptions-Aktivatoren in der Lymphomzelle gesucht. Mit dem Auffinden würden anschließend die stromaufwärts des Signalweges, in der Plasmamembran sitzenden Rezeptoren auf ihre Expressionshöhe im Tumorzellen analysiert. Ein Beispiel für ein überexprimiertes Zielprotein könnte der in der SEREX-Analyse identifizierte Transkriptionsfaktor FOXM1 sein. Nach Bestätigung seiner beobachteten Expression in Tumorgewebe von Sézary Syndrom, wäre es interessant herauszufinden, ob der stromaufwärts von FOXM1 liegende plasmamembranständige Rezeptor Patched im Sézary Syndrom überexprimiert oder auch mutiert vorliegt. Es wäre folglich eine Herangehensweise, die ihren Startpunkt im Inneren der Zelle hätte. Sie birgt die Gefahr, dass für einzelne Zielproteine keine eindeutig zugehörigen Signal-Rezeptoren auf der Oberfläche existieren, weil sich Signalwege oft durchkreuzen und eher ein Signal-Übertragungsnetzwerk bilden. Allerdings könnten mit überexprimierten Zielproteinen einige Signalwege mit ihren Oberflächenrezeptoren näher beleuchtet werden.

Die Suche nach Mitgliedern von Signaltransduktionswegen ist auch deshalb vielversprechend, weil die hier durchgeführte Untersuchung von „Lipid rafts“ der CTCL-Zelllinie HuT78 vermuten läßt, dass ihre Konzentration in CTCL-Zellen erhöht ist. Unter den in „Lipid rafts“ lokalisierten Rezeptoren wurden der Insulin Rezeptor, Hedgehog, Integrine, der T-Zell Rezeptor und Wachstumsfaktor-Rezeptoren wie der EGF-Rezeptor gefunden, die alle eine aktivierende Rolle bei Zellwachstum spielen. Da zum Beispiel von Wachstumsfaktor-Rezeptoren in diversen Tumorarten wie HER2/neu in Brustkrebs eine Überexpression nachgewiesen wurde, könnte es im Hinblick auf Antikörpertherapien sehr interessant sein, ihre Expression auch beim kutanen T-Zell Lymphom zu untersuchen. Somit hätte diese Herangehensweise den gleichen Ausgangspunkt wie in dieser Arbeit, nämlich an der Zelloberfläche. Allerdings wäre sie auf eine bestimmte Region, den „Lipid rafts“, beschränkt.

Vielleicht könnte mit einem dieser alternativen Wege die Liste der Kandidatenproteine verlängert werden, auf der bislang nur CD52 und CD4 stehen, die in fortgeschrittenen Studien auf ihre therapeutische Fähigkeiten im kutanen T-Zell Lymphom untersucht werden.

## 5. LITERATUR

- Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, Herlyn M, Buck CA (1990) Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 50:6757-6764.
- Asadullah K, Docke WD, Haeussler A, Sterry W, Volk HD (1996) Progression of mycosis fungoides is associated with increasing cutaneous expression of interleukin-10 mRNA. *J Invest Dermatol* 107:833-837.
- Axelrod PI, Lorber B, Vonderheid EC (1992) Infections complicating mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Jama* 267:1354-1358.
- Bagot M, Nikolova M, Schirm-Chabanette F, Wechsler J, Boumsell L, Bensussan A (2001a) Crosstalk between tumor T lymphocytes and reactive T lymphocytes in cutaneous T cell lymphomas. *Ann N Y Acad Sci* 941:31-38.
- Bagot M, Moretta A, Sivori S, Biassoni R, Cantoni C, Bottino C, Boumsell L, Bensussan A (2001b) CD4(+) cutaneous T-cell lymphoma cells express the p140-killer cell immunoglobulin-like receptor. *Blood* 97:1388-1391.
- Bagot M, Echchakir H, Mami-Chouaib F, Delfau-Larue MH, Charue D, Bernheim A, Chouaib S, Boumsell L, Bensussan A (1998) Isolation of tumor-specific cytotoxic CD4+ and CD4+CD8dim+ T-cell clones infiltrating a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 91:4331-4341.
- Behr TM, Wormann B, Gramatzki M, Riggert J, Gratz S, Behe M, Griesinger F, Sharkey RM, Kolb HJ, Hiddemann W, Goldenberg DM, Becker W (1999) Low- versus high-dose radioimmunotherapy with humanized anti-CD22 or chimeric anti-CD20 antibodies in a broad spectrum of B cell-associated malignancies. *Clin Cancer Res* 5:3304s-3314s.
- Berger C, Hanlon D, Kanada D, Dhodapkar M, Lombillo V, Wang N, Christensen I, Howe G, Crouch J, El-Fishawy P, Edelson R (2002) The growth of cutaneous T-cell lymphoma is stimulated by immature dendritic cells. *Blood* 99:2929-2939.
- Berger CL, Longley J, Hanlon D, Girardi M, Edelson R (2001) The clonotypic T cell receptor is a source of tumor-associated antigens in cutaneous T cell lymphoma. *Ann N Y Acad Sci* 941:106-122.
- Berger CL, Tigelaar R, Cohen J, Mariwalla K, Trinh J, Wang N, Edelson RL (2005) Cutaneous T-cell lymphoma: malignant proliferation of T-regulatory cells. *Blood* 105:1640-1647.
- Bock J, Gulbins E (2003) The transmembranous domain of CD40 determines CD40 partitioning into lipid rafts. *FEBS Lett* 534:169-174.
- Botzler C, Schmidt J, Luz A, Jennen L, Issels R, Multhoff G (1998) Differential Hsp70 plasma-membrane expression on primary human tumors and metastases in mice with severe combined immunodeficiency. *Int J Cancer* 77:942-948.
- Boulianne GL, Hozumi N, Shulman MJ (1984) Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature* 312:643-646.
- Boyd AW, Wawryk SO, Burns GF, Fecondo JV (1988) Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) has a central role in cell-cell contact-mediated immune mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3095-3099.
- Boyum A (1976) Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scandinavian journal of immunology Suppl* 5:9-15.
- Buhl L, Sogaard H (1997) Immunohistochemical expression of IL-10 in mycosis fungoides. *Exp Dermatol* 6:195-198.
- Buist MR, Kenemans P, van Kamp GJ, Haisma HJ (1995) Minor human antibody response to a mouse and chimeric monoclonal antibody after a single i.v. infusion in ovarian carcinoma patients: a comparison of five assays. *Cancer Immunol Immunother* 40:24-30.

- Burton DR, Barbas CF, 3rd (1993) Human antibodies to HIV-1 by recombinant DNA methods. *Chem Immunol* 56:112-126.
- Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JB, Henner D, Wong WL, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM (1992) Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4285-4289.
- Clark KL, Halay ED, Lai E, Burley SK (1993) Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* 364:412-420.
- Damle NK, Klussman K, Leytze G, Aruffo A, Linsley PS, Ledbetter JA (1993) Costimulation with integrin ligands intercellular adhesion molecule-1 or vascular cell adhesion molecule-1 augments activation-induced death of antigen-specific CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 151:2368-2379.
- Dearden C, Matutes E, Catovsky D (2000) Pentostatin treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Oncology (Williston Park)* 14:37-40.
- Diederer PV, van Weelden H, Sanders CJ, Toonstra J, van Vloten WA (2003) Narrowband UVB and psoralen-UVA in the treatment of early-stage mycosis fungoides: a retrospective study. *J Am Acad Dermatol* 48:215-219.
- Dippel E, Klemke CD, Goerdts S (2003) Current status of cutaneous t-cell lymphoma: molecular diagnosis, pathogenesis, therapy and future directions. *Onkologie* 26:477-483.
- Dummer R, Sigg-Zemann S, Kalthof K, Muletta S, Meyer JC, Burg G (1994) Various cytokines modulate ICAM-1 shedding on melanoma- and CTCL-derived cell lines: inverse regulation of ICAM-1 shedding in a Sezary cell line by interferon-gamma. *Dermatology* 189:120-124.
- Dummer R, Dobbeling U, Geertsens R, Willers J, Burg G, Pavlovic J (2001) Interferon resistance of cutaneous T-cell lymphoma-derived clonal T-helper 2 cells allows selective viral replication. *Blood* 97:523-527.
- Dummer R, Heald PW, Nestle FO, Ludwig E, Laine E, Hemmi S, Burg G (1996) Sezary syndrome T-cell clones display T-helper 2 cytokines and express the accessory factor-1 (interferon-gamma receptor beta-chain). *Blood* 88:1383-1389.
- Dummer R, Michie SA, Kell D, Gould JW, Haeflner AC, Smoller BR, Warnke RA, Wood GS (1995) Expression of bcl-2 protein and Ki-67 nuclear proliferation antigen in benign and malignant cutaneous T-cell infiltrates. *J Cutan Pathol* 22:11-17.
- Duvic (2005) Humax-CD4 a fully human anti-CD4 monoclonal antibody\_ phase II trial in cutaneous t-cell lymphoma. *Annals of Oncology* 16:v70.
- Echchakir H, Bagot M, Dorothee G, Martinvalet D, Le Gouvello S, Boumsell L, Chouaib S, Bensussan A, Mami-Chouaib F (2000) Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J Invest Dermatol* 115:74-80.
- Edelson RL (1980) Cutaneous T cell lymphoma: mycosis fungoides, Sezary syndrome, and other variants. *J Am Acad Dermatol* 2:89-106.
- Eichmüller S (2002) Towards defining specific antigens for cutaneous lymphomas. *Onkologie* 25:448-454.
- Eichmüller S, Usener D, Thiel D, Schadendorf D (2003) Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: expression and sero-reactivity. *Int J Cancer* 104:482-487.
- Eichmüller S, Usener D, Dummer R, Stein A, Thiel D, Schadendorf D (2001) Serological detection of cutaneous T-cell lymphoma-associated antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:629-634.
- Ellis JA, Jackman MR, Luzio JP (1992) The post-synthetic sorting of endogenous membrane proteins examined by the simultaneous purification of apical and basolateral plasma membrane fractions from Caco-2 cells. *Biochem J* 283:553-560.

- Feldman DE, Thulasiraman V, Ferreyra RG, Frydman J (1999) Formation of the VHL-elongin BC tumor suppressor complex is mediated by the chaperonin TRiC. *Mol Cell* 4:1051-1061.
- Ferrarini M, Heltai S, Zocchi MR, Rugarli C (1992) Unusual expression and localization of heat-shock proteins in human tumor cells. *Int J Cancer* 51:613-619.
- Folgueras AR, Pendas AM, Sanchez LM, Lopez-Otin C (2004) Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol* 48:411-424.
- Foss FM, Waldmann TA (2003) Interleukin-2 receptor-directed therapies for cutaneous lymphomas. *Hematol Oncol Clin North Am* 17:1449-1458.
- Foss FM, Koc Y, Stetler-Stevenson MA, Nguyen DT, O'Brien MC, Turner R, Sausville EA (1994a) Costimulation of cutaneous T-cell lymphoma cells by interleukin-7 and interleukin-2: potential autocrine or paracrine effectors in the Sezary syndrome. *J Clin Oncol* 12:326-335.
- Foss FM, Ihde DC, Linnoila IR, Fischmann AB, Schechter GP, Cotelingam JD, Steinberg SM, Ghosh BC, Stocker JL, Bastian A, et al. (1994b) Phase II trial of fludarabine phosphate and interferon alfa-2a in advanced mycosis fungoides/Sezary syndrome. *J Clin Oncol* 12:2051-2059.
- Gatza E, Okada CY (2002) Tumor cell lysate-pulsed dendritic cells are more effective than TCR Id protein vaccines for active immunotherapy of T cell lymphoma. *J Immunol* 169:5227-5235.
- Ginis I, Faller DV (2000) Hypoxia affects tumor cell invasiveness in vitro: the role of hypoxia-activated ligand HAL1/13 (Ku86 autoantigen). *Cancer Lett* 154:163-174.
- Goerdts S, Trautmann C, Kutting B, Ramaker J, Schmuth M, Thiel E, Luger T, Stein H, Orfanos CE (1996) [Rare variants of cutaneous T-cell lymphomas]. *Hautarzt* 47:96-105.
- Gootenberg JE, Ruscetti FW, Mier JW, Gazdar A, Gallo RC (1981) Human cutaneous T cell lymphoma and leukemia cell lines produce and respond to T cell growth factor. *J Exp Med* 154:1403-1418.
- Gossler U, Jonas P, Luz A, Lifka A, Naor D, Hamann A, Holzmann B (1996) Predominant role of alpha 4-integrins for distinct steps of lymphoma metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:4821-4826.
- Gottlieb SL, Wolfe JT, Fox FE, DeNardo BJ, Macey WH, Bromley PG, Lessin SR, Rook AH (1996) Treatment of cutaneous T-cell lymphoma with extracorporeal photopheresis monotherapy and in combination with recombinant interferon alfa: a 10-year experience at a single institution. *J Am Acad Dermatol* 35:946-957.
- Greene MH, Dalager NA, Lamberg SI, Argyropoulos CE, Fraumeni JF, Jr. (1979) Mycosis fungoides: epidemiologic observations. *Cancer Treat Rep* 63:597-606.
- Hall WW, Liu CR, Schneewind O, Takahashi H, Kaplan MH, Roupe G, Vahlne A (1991) Deleted HTLV-I provirus in blood and cutaneous lesions of patients with mycosis fungoides. *Science* 253:317-320.
- Harris M (2004) Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *THE LANCET Oncology* 5:292-302.
- Hartmann TB, Thiel D, Dummer R, Schadendorf D, Eichmüller S (2004) SEREX identification of new tumour-associated antigens in cutaneous T-cell lymphoma. *Br J Dermatol* 150:252-258.
- Heald P, Rook A, Perez M, Wintroub B, Knobler R, Jegasothy B, Gasparro F, Berger C, Edelson R (1992) Treatment of erythrodermic cutaneous T-cell lymphoma with extracorporeal photochemotherapy. *J Am Acad Dermatol* 27:427-433.
- Hoogenboom HR, Marks JD, Griffiths AD, Winter G (1993) Building antibodies from their genes. *Rev Fr Transfus Hemobiol* 36:19-47.

- Hoppe RT, Wood GS, Abel EA (1990) Mycosis fungoides and the Sezary syndrome: pathology, staging, and treatment. *Curr Probl Cancer* 14:293-371.
- Hu B, Burkhardt R, Schulte D, Musahl C, Knippers R (1993) The P1 family: a new class of nuclear mammalian proteins related to the yeast Mcm replication proteins. *Nucleic Acids Res* 21:5289-5293.
- Huhtala P, Humphries MJ, McCarthy JB, Tremble PM, Werb Z, Damsky CH (1995) Cooperative signaling by alpha 5 beta 1 and alpha 4 beta 1 integrins regulates metalloproteinase gene expression in fibroblasts adhering to fibronectin. *J Cell Biol* 129:867-879.
- Ilangumaran S, Briol A, Hoessli DC (1997) Distinct interactions among GPI-anchored, transmembrane and membrane associated intracellular proteins, and sphingolipids in lymphocyte and endothelial cell plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1328:227-236.
- Isomura M, Okui K, Fujiwara T, Shin S, Nakamura Y (1996) Isolation and mapping of RAB2L, a human cDNA that encodes a protein homologous to RalGDS. *Cytogenet Cell Genet* 74:263-265.
- Jenster G (1999) The role of the androgen receptor in the development and progression of prostate cancer. *Semin Oncol* 26:407-421.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature* 321:522-525.
- Kaltoft K, Bisballe S, Rasmussen HF, Thestrup-Pedersen K, Thomsen K, Sterry W (1987) A continuous T-cell line from a patient with Sezary syndrome. *Arch Dermatol Res* 279:293-298.
- Kaltoft K, Bisballe S, Dyrberg T, Boel E, Rasmussen PB, Thestrup-Pedersen K (1992) Establishment of two continuous T-cell strains from a single plaque of a patient with mycosis fungoides. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A:161-167.
- Kamarashev J, Burg G, Kempf W, Hess Schmid M, Dummer R (1998) Comparative analysis of histological and immunohistological features in mycosis fungoides and Sezary syndrome. *J Cutan Pathol* 25:407-412.
- Kanavaros P, Ioannidou D, Tzardi M, Datseris G, Katsantonis J, Delidis G, Tosca A (1994) Mycosis fungoides: expression of C-myc p62 p53, bcl-2 and PCNA proteins and absence of association with Epstein-Barr virus. *Pathol Res Pract* 190:767-774.
- Kennedy GA, Seymour JF, Wolf M, Januszewicz H, Davison J, McCormack C, Ryan G, Prince HM (2003) Treatment of patients with advanced mycosis fungoides and Sezary syndrome with alemtuzumab. *Eur J Haematol* 71:250-256.
- Kerjan P, Cerini C, Semeriva M, Mirande M (1994) The multienzyme complex containing nine aminoacyl-tRNA synthetases is ubiquitous from Drosophila to mammals. *Biochim Biophys Acta* 1199:293-297.
- Khan ZM, Sebenik M, Zucker-Franklin D (1996) Localization of human T-cell lymphotropic virus-1 tax proviral sequences in skin biopsies of patients with mycosis fungoides by in situ polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 106:667-672.
- Kiat LS, Hui KM, Gopalan G (2002) Aurora-A kinase interacting protein (AIP), a novel negative regulator of human Aurora-A kinase. *J Biol Chem* 277:45558-45565.
- Knox SJ, Levy R, Hodgkinson S, Bell R, Brown S, Wood GS, Hoppe R, Abel EA, Steinman L, Berger RG, et al. (1991) Observations on the effect of chimeric anti-CD4 monoclonal antibody in patients with mycosis fungoides. *Blood* 77:20-30.
- Ko YG, Kang YS, Kim EK, Park SG, Kim S (2000) Nucleolar localization of human methionyl-tRNA synthetase and its role in ribosomal RNA synthesis. *J Cell Biol* 149:567-574.

- Ko YG, Kim EY, Kim T, Park H, Park HS, Choi EJ, Kim S (2001a) Glutamine-dependent antiapoptotic interaction of human glutaminyl-tRNA synthetase with apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biol Chem* 276:6030-6036.
- Ko YG, Park H, Kim T, Lee JW, Park SG, Seol W, Kim JE, Lee WH, Kim SH, Park JE, Kim S (2001b) A cofactor of tRNA synthetase, p43, is secreted to up-regulate proinflammatory genes. *J Biol Chem* 276:23028-23033.
- Kohler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256:495-497.
- Korver W, Roose J, Heinen K, Weghuis DO, de Bruijn D, van Kessel AG, Clevers H (1997) The human TRIDENT/HFH-11/FKHL16 gene: structure, localization, and promoter characterization. *Genomics* 46:435-442.
- Krupczak-Hollis K, Wang X, Kalinichenko VV, Gusarova GA, Wang IC, Dennewitz MB, Yoder HM, Kiyokawa H, Kaestner KH, Costa RH (2004) The mouse Forkhead Box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis. *Dev Biol* 276:74-88.
- Kubo M, Nakamura M, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, Nomura M, Kuroki S, Katano M (2004) Hedgehog signaling pathway is a new therapeutic target for patients with breast cancer. *Cancer Res* 64:6071-6074.
- Kurzrock R, Pilat S, Duvic M (1999) Pentostatin therapy of T-cell lymphomas with cutaneous manifestations. *J Clin Oncol* 17:3117-3121.
- Laetsch B, Haffner AC, Dobbeling U, Seifert B, Ludwig E, Burg G, Dummer R (2000) CD4 + /CD7- T cell frequency and polymerase chain reaction-based clonality assay correlate with stage in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 114:107-111.
- Limon J, Nedoszytko B, Brozek I, Hellmann A, Zajaczek S, Lubinski J, Mrozek K (1995) Chromosome aberrations, spontaneous SCE, and growth kinetics in PHA-stimulated lymphocytes of five cases with Sezary syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 83:75-81.
- Liu B, Liao J, Rao X, Kushner SA, Chung CD, Chang DD, Shuai K (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10626-10631.
- Llano E, Pendas AM, Freije JP, Nakano A, Knauper V, Murphy G, Lopez-Otin C (1999) Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors. *Cancer Res* 59:2570-2576.
- Llorca O, Smyth MG, Carrascosa JL, Willison KR, Radermacher M, Steinbacher S, Valpuesta JM (1999) 3D reconstruction of the ATP-bound form of CCT reveals the asymmetric folding conformation of a type II chaperonin. *Nat Struct Biol* 6:639-642.
- Lucero H, Gae D, Taccioli GE (2003) Novel localization of the DNA-PK complex in lipid rafts: a putative role in the signal transduction pathway of the ionizing radiation response. *J Biol Chem* 278:22136-22143.
- Lundin J, Hagberg H, Repp R, Cavallin-Stahl E, Freden S, Juliusson G, Rosenblad E, Tjonnfjord G, Wiklund T, Osterborg A (2003) Phase 2 study of alemtuzumab (anti-CD52 monoclonal antibody) in patients with advanced mycosis fungoides/Sezary syndrome. *Blood* 101:4267-4272.
- Lynch EM, Moreland RB, Ginis I, Perrine SP, Faller DV (2001) Hypoxia-activated ligand HAL-1/13 is lupus autoantigen Ku80 and mediates lymphoid cell adhesion in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* 280:C897-911.
- Madri JA, Graesser D, Haas T (1996) The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol* 74:749-757.
- Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, Bodkin DJ, White CA, Liles TM, Royston I, Varns C, Rosenberg J, Levy R (1997a) IDEC-C2B8: results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 15:3266-3274.
- Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles TM, Dallaire BK, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R (1997b)

- IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90:2188-2195.
- Marchase RB, Koro LA, Kelly CM, McClay DR (1982) A possible role for ligatin and the phosphoglycoproteins it binds in calcium-dependent retinal cell adhesion. *J Cell Biochem* 18:461-468.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399:271-275.
- McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK (1998) Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol* 16:2825-2833.
- Mimori T, Ohosone Y, Hama N, Suwa A, Akizuki M, Homma M, Griffith AJ, Hardin JA (1990) Isolation and characterization of cDNA encoding the 80-kDa subunit protein of the human autoantigen Ku (p70/p80) recognized by autoantibodies from patients with scleroderma-polymyositis overlap syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1777-1781.
- Miyazawa M, Takahashi S, Kawaguchi H, Nagatani T, Higuchi M, Matsuzaki T, Iemoto G, Kim ST, Baba N, Miyamoto H, et al. (1995) Low expression of adhesion molecules in a case of cutaneous T-cell lymphoma. *J Dermatol* 22:659-664.
- Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Muller E, Meier T, Wilmanns W, Issels RD (1995) A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells. *Int J Cancer* 61:272-279.
- Nielsen M, Kastel CG, Eriksen KW, Woetmann A, Stokkedal T, Kaltoft K, Geisler C, Röpke C, Odum N (1999) Inhibition of constitutively activated Stat3 correlates with altered Bcl-2/Bax expression and induction of apoptosis in mycosis fungoides tumor cells. *Leukemia* 13:735-738.
- Nigam AK, Savage FJ, Boulous PB, Stamp GW, Liu D, Pignatelli M (1993) Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Br J Cancer* 68:507-514.
- Nikolova M, Tawab A, Marie-Cardine A, Bagot M, Boumsell L, Bensussan A (2001) Increased expression of a novel early activation surface membrane receptor in cutaneous T cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol* 116:731-738.
- Okazaki Y, Ohno H, Takase K, Ochiai T, Saito T (2000) Cell surface expression of calnexin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 275:35751-35758.
- Pei D (1999) Identification and characterization of the fifth membrane-type matrix metalloproteinase MT5-MMP. *J Biol Chem* 274:8925-8932.
- Piekarz RL, Robey R, Sandor V, Bakke S, Wilson WH, Dahmouch L, Kingma DM, Turner ML, Altemus R, Bates SE (2001) Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report. *Blood* 98:2865-2868.
- Pignatelli M, Smith ME, Bodmer WF (1990) Low expression of collagen receptors in moderate and poorly differentiated colorectal adenocarcinomas. *Br J Cancer* 61:636-638.
- Pilarsky C, Wenzig M, Specht T, Saeger HD, Grutzmann R (2004) Identification and validation of commonly overexpressed genes in solid tumors by comparison of microarray data. *Neoplasia* 6:744-750.
- Press OW, Appelbaum F, Ledbetter JA, Martin PJ, Zarling J, Kidd P, Thomas ED (1987) Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas. *Blood* 69:584-591.

- Qin JZ, Kamarashev J, Zhang CL, Dummer R, Burg G, Dobbeling U (2001) Constitutive and interleukin-7- and interleukin-15-stimulated DNA binding of STAT and novel factors in cutaneous T cell lymphoma cells. *J Invest Dermatol* 117:583-589.
- Quaglino P, Fierro MT, Rossotto GL, Savoia P, Bernengo MG (2004) Treatment of advanced mycosis fungoides/Sezary syndrome with fludarabine and potential adjunctive benefit to subsequent extracorporeal photochemotherapy. *Br J Dermatol* 150:327-336.
- Quiros PA, Kacinski BM, Wilson LD (1996) Extent of skin involvement as a prognostic indicator of disease free and overall survival of patients with T3 cutaneous T-cell lymphoma treated with total skin electron beam radiation therapy. *Cancer* 77:1912-1917.
- Reddy SA, Okada C, Wong C, Bahler D, Levy R (2001) T cell antigen receptor vaccines for active therapy of T cell malignancies. *Ann N Y Acad Sci* 941:97-105.
- Reichert JM (2001) Monoclonal antibodies in the clinic. *Nat Biotechnol* 19:819-822.
- Rincon J, Prieto J, Patarroyo M (1992) Expression of integrins and other adhesion molecules in Epstein-Barr virus-transformed B lymphoblastoid cells and Burkitt's lymphoma cells. *Int J Cancer* 51:452-458.
- Roebuck KA, Finnegan A (1999) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 66:876-888.
- Rook AH, Heald P (1995) The immunopathogenesis of cutaneous T-cell lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 9:997-1010.
- Rook AH, Prystowsky MB, Cassin M, Boufal M, Lessin SR (1991) Combined therapy for Sezary syndrome with extracorporeal photochemotherapy and low-dose interferon alfa therapy. Clinical, molecular, and immunologic observations. *Arch Dermatol* 127:1535-1540.
- Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11810-11813.
- Sakai K, Kurimoto M, Tsugu A, Hubbard SL, Trimble WS, Rutka JT (2002) Expression of Nedd5, a mammalian septin, in human brain tumors. *J Neurooncol* 57:169-177.
- Sallah S, Wan JY, Nguyen NP (2001) Treatment of refractory T-cell malignancies using gemcitabine. *Br J Haematol* 113:185-187.
- Sandor V, Bakke S, Robey RW, Kang MH, Blagosklonny MV, Bender J, Brooks R, Piekarz RL, Tucker E, Figg WD, Chan KK, Goldspiel B, Fojo AT, Balcerzak SP, Bates SE (2002) Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms. *Clin Cancer Res* 8:718-728.
- Shapiro PE, Warburton D, Berger CL, Edelson RL (1987) Clonal chromosomal abnormalities in cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 28:267-276.
- Sharma M, Li X, Wang Y, Zarnegar M, Huang CY, Palvimo JJ, Lim B, Sun Z (2003) hZimp10 is an androgen receptor co-activator and forms a complex with SUMO-1 at replication foci. *Embo J* 22:6101-6114.
- Sheng T, Li C, Zhang X, Chi S, He N, Chen K, McCormick F, Gatalica Z, Xie J (2004) Activation of the hedgehog pathway in advanced prostate cancer. *Mol Cancer* 3:29.
- Simons K, Toomre D (2000) Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 1.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, S. S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 433:783-792.



- Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 6:175-182.
- Soulie P, Carrozzino F, Pepper MS, Strongin AY, Poupon MF, Montesano R (2005) Membrane-type-1 matrix metalloproteinase confers tumorigenicity on nonmalignant epithelial cells. *Oncogene* 24:1689-1697.
- Starkebaum G, Loughran TP, Jr., Waters CA, Ruscetti FW (1991) Establishment of an IL-2 independent, human T-cell line possessing only the p70 IL-2 receptor. *Int J Cancer* 49:246-253.
- Storz M, Zepter K, Kamarashev J, Dummer R, Burg G, Haffner AC (2001) Coexpression of CD40 and CD40 ligand in cutaneous T-cell lymphoma (mycosis fungoides). *Cancer Res* 61:452-454.
- Tai YT, Podar K, Kraeft SK, Wang F, Young G, Lin B, Gupta D, Chen LB, Anderson KC (2002) Translocation of Ku86/Ku70 to the multiple myeloma cell membrane: functional implications. *Exp Hematol* 30:212-220.
- Tan RS, Butterworth CM, McLaughlin H, Malka S, Samman PD (1974) Mycosis fungoides--a disease of antigen persistence. *Br J Dermatol* 91:607-616.
- Teh MT, Wong ST, Neill GW, Ghali LR, Philpott MP, Quinn AG (2002) FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res* 62:4773-4780.
- Tensen CP, Vermeer MH, van der Stoop PM, van Beek P, Scheper RJ, Boorsma DM, Willemze R (1998) Epidermal interferon-gamma inducible protein-10 (IP-10) and monokine induced by gamma-interferon (Mig) but not IL-8 mRNA expression is associated with epidermotropism in cutaneous T cell lymphomas. *J Invest Dermatol* 111:222-226.
- Teoh G, Urashima M, Greenfield EA, Nguyen KA, Lee JF, Chauhan D, Ogata A, Treon SP, Anderson KC (1998) The 86-kD subunit of Ku autoantigen mediates homotypic and heterotypic adhesion of multiple myeloma cells. *J Clin Invest* 101:1379-1388.
- Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernandez-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M (2003) Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425:851-856.
- Tsimberidou AM, Giles F, Duvic M, Fayad L, Kurzrock R (2004) Phase II study of pentostatin in advanced T-cell lymphoid malignancies: update of an M.D. Anderson Cancer Center series. *Cancer* 100:342-349.
- Tsunezuka Y, Kinoh H, Takino T, Watanabe Y, Okada Y, Shinagawa A, Sato H, Seiki M (1996) Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay. *Cancer Res* 56:5678-5683.
- Tuyp E, Burgoyne A, Aitchison T, MacKie R (1987) A case-control study of possible causative factors in mycosis fungoides. *Arch Dermatol* 123:196-200.
- Valpuesta JM, Martin-Benito J, Gomez-Puertas P, Carrascosa JL, Willison KR (2002) Structure and function of a protein folding machine: the eukaryotic cytosolic chaperonin CCT. *FEBS Lett* 529:11-16.
- van Doorn R, Dijkman R, Vermeer MH, Starink TM, Willemze R, Tensen CP (2002) A novel splice variant of the Fas gene in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Cancer Res* 62:5389-5392.
- van Doorn R, Dijkman R, Vermeer MH, Out-Luiting JJ, van der Raaij-Helmer EM, Willemze R, Tensen CP (2004) Aberrant expression of the tyrosine kinase receptor EphA4 and the transcription factor twist in Sezary syndrome identified by gene expression analysis. *Cancer Res* 64:5578-5586.

- van Zaanen HC, Lokhorst HM, Aarden LA, Rensink HJ, Warnaar SO, van der Lelie J, van Oers MH (1998) Chimaeric anti-interleukin 6 monoclonal antibodies in the treatment of advanced multiple myeloma: a phase I dose-escalating study. *Br J Haematol* 102:783-790.
- Vowels BR, Lessin SR, Cassin M, Jaworsky C, Benoit B, Wolfe JT, Rook AH (1994) Th2 cytokine mRNA expression in skin in cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol* 103:669-673.
- Wadle A, Mischo A, Imig J, Wullner B, Hensel D, Watzig K, Neumann F, Kubuschok B, Schmidt W, Old LJ, Pfreundschuh M, Renner C (2005) Serological identification of breast cancer-related antigens from a *Saccharomyces cerevisiae* surface display library. *Int J Cancer* 117:104-113.
- Waldmeier PC, Zimmermann K, Qian T, Tintelnot-Blomley M, Lemasters JJ (2003) Cyclophilin D as a drug target. *Curr Med Chem* 10:1485-1506.
- Walsh G (2003) Biopharmaceutical benchmarks--2003. *Nat Biotechnol* 21:865-870.
- Wang C, McCarty IM, Balazs L, Li Y, Steiner MS (2002a) Immunohistological detection of BRAF25 in human prostate tumor and cancer specimens. *Biochem Biophys Res Commun* 295:136-141.
- Wang X, Kiyokawa H, Dennewitz MB, Costa RH (2002b) The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:16881-16886.
- Wang Y, Han KJ, Pang XW, Vaughan HA, Qu W, Dong XY, Peng JR, Zhao HT, Rui JA, Leng XS, Cebon J, Burgess AW, Chen WF (2002c) Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol* 169:1102-1109.
- Wechsler J, Bagot M, Nikolova M, Parolini S, Martin-Garcia N, Boumsell L, Moretta A, Bensussan A (2003) Killer cell immunoglobulin-like receptor expression delineates in situ Sezary syndrome lymphocytes. *J Pathol* 199:77-83.
- Wiest DL, Burgess WH, McKean D, Kears KP, Singer A (1995) The molecular chaperone calnexin is expressed on the surface of immature thymocytes in association with clonotype-independent CD3 complexes. *Embo J* 14:3425-3433.
- Wu L, Wu H, Ma L, Sangiorgi F, Wu N, Bell JR, Lyons GE, Maxson R (1997) Miz1, a novel zinc finger transcription factor that interacts with Msx2 and enhances its affinity for DNA. *Mech Dev* 65:3-17.
- Yang J, Mani S, Donaher J, Ramaswamy S, Itzykson R, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg R (2004) Twist, a Master Regulator of Morphogenesis, Plays an Essential Role in Tumor Metastasis. *Cell* 117:927-939.
- Ye H, Kelly TF, Samadani U, Lim L, Rubio S, Overdier DG, Roebuck KA, Costa RH (1997) Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Mol Cell Biol* 17:1626-1641.
- Yokota S, Yamamoto Y, Shimizu K, Momoi H, Kamikawa T, Yamaoka Y, Yanagi H, Yura T, Kubota H (2001) Increased expression of cytosolic chaperonin CCT in human hepatocellular and colonic carcinoma. *Cell Stress Chaperones* 6:345-350.
- Zinzani PL, Magagnoli M, Bendandi M, Orcioni GF, Gherlinzoni F, Albertini P, Pileri SA, Tura S (1998) Therapy with gemcitabine in pretreated peripheral T-cell lymphoma patients. *Ann Oncol* 9:1351-1353.
- Zutter MM, Mazoujian G, Santoro SA (1990) Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast. *Am J Pathol* 137:863-870.

## 6. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

### 7.1. Artikel

**Lee M**, Kistler C, Li F, Hartmann TB, Dippel E, Schadendorf D, Eichmüller S  
Immunoscreening of a cutaneous T-cell lymphoma library for plasma membrane proteins  
(in Vorbereitung)

Breitkreutz R, Zhang W, **Lee M**, Hoffmann A, Tokus M, Su Q, Schröder CH  
Hepatitis B virus nucleic acids circulating in the blood: distinct patterns in HBs carriers with  
hepatocellular carcinoma  
Ann N Y Acad Sci, 2001 (945):195-206

### 7.2. Tagungsbeiträge

**Lee M**, Kistler C, Li F, Schadendorf D, Eichmüller S  
Identifizierung von spezifischen Plasmamembranproteinen des kutanen T-Zell Lymphoms  
Aktuelle Dermatologie, 2004, (8/9), P45

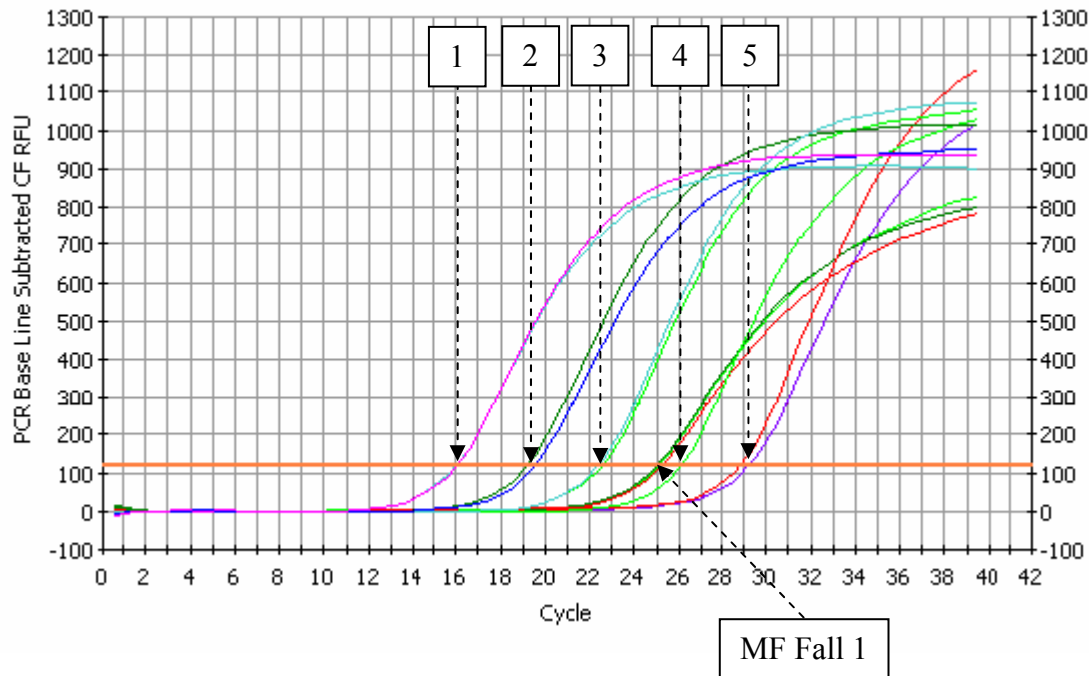
**Lee M**, Kistler C, Dahlke A, Schadendorf D, Eichmüller S  
Searching for specific plasma membrane proteins of CTCL cell lines  
International Symposium on the biology and immunology of cutaneous lymphoma, Berlin, 2005,  
Abstract 63

**Lee M**, Kistler C, Dahlke A, Schadendorf D, Eichmüller S  
Identification of plasma membrane proteins of cutaneous T-cell lymphoma  
Annals of Oncology, 2005, (16, Sup. 5), v128

Kistler C, Fellenberg F, **Lee M**, Schadendorf D, Eichmüller S  
Characterisation of GBP-5ta: Guanylate binding protein associated with cutaneous T-cell  
lymphoma  
The XXII Symposium of the International association for comparative research on leukemia  
and related diseases, Heidelberg, 2005

## 7. ANHANG 1

Beispiel einer Real-time PCR Messung der Probe MF Fall 1 der Integrin  $\alpha 4$ -Analyse b (siehe auch Anhang 2 „Rohdaten von Integrin  $\alpha 4$ )



1: Standard 1 ( $2,5 \times 10^2$ )    3: Standard 3 ( $2,5 \times 10^4$ )    5: Standard 5 ( $2,5 \times 10^6$ )  
 2: Standard 2 ( $2,5 \times 10^3$ )    4: Standard 4 ( $2,5 \times 10^5$ )    MF Fall 1: ?

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der Software „Optical System, Version 1.0 der Firma Bio-Rad. Im obigen Diagramm sind die Messkurven der fünf Standardproben und die der Probe MF Fall 1 dargestellt. Es wurden insgesamt zwei Parallelmessungen für die Standardproben und drei Parallelmessungen der unbekannten Probe durchgeführt.

An der X-Achse des Diagramms ist die PCR-Zyklenzahl angegeben. Mit „PCR base line subtracted CF RFU“ (curve fit relative fluorescence units) an der Y-Achse ist hier als Fluoreszenzeinheit das Vielfache des über die Hintergrund-Fluoreszenz gestiegenen Wertes angegeben. Das Gerät misst die Zyklenzahl, bei der der Fluoreszenzanstieg in die lineare Phase übergeht. Dies ist hier mit der orangefarbenen horizontalen Linie dargestellt (im Programm „threshold“ (Schwellwert) genannt). Die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz den Schwellwert erreicht wird auch als Ct-Wert bezeichnet.

Mit den Fluoreszenz-Messungen der Standardproben, deren Kopiezahlen dem Messgerät eingegeben waren, konnte für die Probe MF Fall 1 die Transkriptzahl von  $4,6 \times 10^3$  (Mittelwert von allen Messungen) ermittelt werden. Auf diese Weise wurden alle

---

Transkriptzahlen der untersuchten Proben aus den jeweiligen Standardkurven abgeleitet, die im folgenden Anhang tabellarisch dargestellt sind.

## 8. ANHANG 2

### 1. Rohdaten der Real-time PCR Analyse von MT5-MMP

Proben	HMBS	MT5-MMP a	MT5-MMP b	MT5a/HMBS	MT5b/HMBS	Mittelwert
MF Fall 1	2650	4380	9550	1,65	3,60	2,63
MF Fall 2	1880	1060	2130	0,56	1,13	0,85
MF Fall 3	2200	969	2030	0,44	0,92	0,68
MF Fall 4	1260	1680	3670	1,33	2,91	2,12
MF Fall 5	513	240	417	0,47	0,81	0,64
MF Fall 6	1490	149	519	0,10	0,35	0,22
MF Fall 7	1650	303	481	0,18	0,29	0,24
BH Fall 1	634	812	2210	1,28	3,49	2,38
BH Fall 2	195	76,3	207	0,39	1,06	0,73
BH Fall 3	899	330	564	0,37	0,63	0,50
BH Fall 4	1490	547	738	0,37	0,50	0,43
BH Fall 5	844	2450	3920	2,90	4,64	3,77
<sup>3</sup> GH Fall 1	455	585	1450	1,29	3,19	2,24
GH Fall 2	1970	4900	9490	2,49	4,82	3,65
GH Fall 3	3870	7950	12600	2,05	3,26	2,66
GH Fall 4	6190	10900	16900	1,76	2,73	2,25
GH Fall 5	5340	13600	20200	2,55	3,78	3,16
GH Fall 6	123	1860	2710	15,12	22,03	18,58
<sup>4</sup> SzS Fall 1	183	82,1	143	0,45	0,78	0,62
SzS Fall 2	667	786	906	1,18	1,36	1,27
SzS Fall 3	106	2590	3640	24,43	34,34	29,39
SzS Fall 4	68,5	1860	3270	27,15	47,74	37,45
SzS Fall 5	101	1830	2490	18,12	24,65	21,39
<sup>5</sup> GP Fall 1	558	2830	4690	5,07	8,41	6,74
GP Fall 2	209	881	3350	4,22	16,03	10,12
GP Fall 3	483	7190	0	14,89	0,00	7,44
GP Fall 4	182	3620	4260	19,89	23,41	21,65
GP Fall 5	318	4470	4130	14,06	12,99	13,52

<sup>1</sup>MF: Hautproben Mycosis fungoides Patienten, <sup>2</sup>BH: Hautproben von Patienten mit benignen Hauterkrankungen, <sup>3</sup>GH: Hautproben von gesunden Personen, <sup>4</sup>SzS: PBMC-Proben von Sézary Syndrom Patienten, <sup>5</sup>GP: PBMC-Proben von gesunden Personen

In den Spalten 2, 3 und 4 sind die abgeleiteten Transkriptzahlen der Fluoreszenz-Messungen von HMBS und MT5-MMP dargestellt (mit a und b sind die beiden Dreifach-Messungen bezeichnet). Es handelt sich dabei um die Mittelwerte der jeweiligen Dreifach-Messungen.

In den Spalten 5 und 6 sind die errechneten Quotienten MT5-MMPa/HMBS und MT5-MMPb/HMBS aufgelistet.

Die Werte in der siebten Spalte ergeben wiederum die errechneten Mittelwerte aus den Quotienten beider Analysen (a und b).

## 2. Rohdaten der Real-time PCR Analyse von Integrin $\alpha 4$

Proben	HMBS	ITGA4 a	ITGA b	ITGAa/HMBS	ITGAb/HMBS	Mittelwert
MF Fall 1	2650	4600	3910	1,74	1,48	1,61
MF Fall 2	1880	3950	3410	2,10	1,81	1,96
MF Fall 3	2200	1100	656	0,50	0,30	0,40
MF Fall 4	1260	5950	4720	4,72	3,75	4,23
MF Fall 5	513	121	108	0,24	0,21	0,22
MF Fall 6	1490	331	225	0,22	0,15	0,19
MF Fall 7	1650	33,9	17	0,02	0,01	0,02
BH Fall 1	634	108	85	0,17	0,13	0,15
BH Fall 2	195	10,3	9	0,05	0,05	0,05
BH Fall 3	899	218	183	0,24	0,20	0,22
BH Fall 4	1490	504	432	0,34	0,29	0,31
BH Fall 5	844	775	636	0,92	0,75	0,84
GH Fall 1	455	384	129	0,84	0,28	0,56
GH Fall 2	1970	437	310	0,22	0,16	0,19
GH Fall 3	3870	890	580	0,23	0,15	0,19
GH Fall 4	6190	3510	2420	0,57	0,39	0,48
GH Fall 5	5340	3690	2130	0,69	0,40	0,54
GH Fall 6	123	98,5	61	0,80	0,50	0,65
SzS Fall 1	183	995	872	5,44	4,77	5,10
SzS Fall 2	667	2140	1960	3,21	2,94	3,07
SzS Fall 3	106	884	625	8,34	5,90	7,12
SzS Fall 4	68,5	3280	2700	47,88	39,42	43,65
SzS Fall 5	101	940	727	9,31	7,20	8,25
GP Fall 1	558	3010	2380	5,39	4,27	4,83
GP Fall 2	209	1670	1510	7,99	7,22	7,61
GP Fall 3	483	5100	4340	10,56	8,99	9,77
GP Fall 4	182	3610	2880	19,84	15,82	17,83
GP Fall 5	318	3180	3770	10,00	11,86	10,93

<sup>1</sup>MF: Hautproben Mycosis fungoides Patienten, <sup>2</sup>BH: Hautproben von Patienten mit benignen Hauterkrankungen, <sup>3</sup>GH: Hautproben von gesunden Personen

<sup>4</sup>SzS: PBMC-Proben von Sézary Syndrom Patienten, <sup>5</sup>GP: PBMC-Proben von gesunden Personen

In den Spalten 2, 3 und 4 sind die abgeleiteten Transkriptzahlen der Fluoreszenz-Messungen von HMBS und Integrin  $\alpha 4$  dargestellt (mit a und b sind die beiden Dreifach-Messungen bezeichnet). Es handelt sich dabei um die Mittelwerte der jeweiligen Dreifach-Messungen.

In den Spalten 5 und 6 sind die errechneten Quotienten Integrin $\alpha 4$  a/HMBS und Integrin $\alpha 4$  b/HMBS aufgelistet.

Die Werte in der siebten Spalte ergeben wiederum die errechneten Mittelwerte aus den Quotienten beider Analysen (a und b).

### 3. Rohdaten der Real-time PCR Analyse von hZimp10

Proben	HMBS	hZimp10 a	hZimp10 b	hZimpa/HMBS	hZimpb/HMBS	Mittelwert
MF Fall 1	2650	178	106	0,07	0,04	0,05
MF Fall 2	1880	482	343	0,26	0,18	0,22
MF Fall 3	2200	47,3	47	0,02	0,02	0,02
MF Fall 4	1260	4,05	0,461	0,00	0,00	0,00
MF Fall 5	513	14	7,73	0,03	0,02	0,02
MF Fall 6	1490	15,2	13,9	0,01	0,01	0,01
MF Fall 7	1650	17,6	6,15	0,01	0,00	0,01
BH Fall 1	634	25,3	31	0,04	0,05	0,04
BH Fall 2	195	13,5	7,95	0,07	0,04	0,06
BH Fall 3	899	63,9	60,9	0,07	0,07	0,07
BH Fall 4	1490	87,4	61,3	0,06	0,04	0,05
BH Fall 5	844	104	43,7	0,12	0,05	0,09
GH Fall 1	455	26	14,2	0,06	0,03	0,04
GH Fall 2	1970	457	484	0,23	0,25	0,24
GH Fall 3	3870	1370	881	0,35	0,23	0,29
GH Fall 4	6190	1020	1150	0,16	0,19	0,18
GH Fall 5	5340	2480	1750	0,46	0,33	0,40
GH Fall 6	123	2,35	2,64	0,02	0,02	0,02
SzS Fall 1	183	4,23	2,3	0,02	0,01	0,02
SzS Fall 2	667	53,2	22,4	0,08	0,03	0,06
SzS Fall 3	106	13,4	4,59	0,13	0,04	0,08
SzS Fall 4	68,5	28,1	6,38	0,41	0,09	0,25
SzS Fall 5	101	15,2	15,6	0,15	0,15	0,15
GP Fall 1	558	171	83,9	0,31	0,15	0,23
GP Fall 2	209	60,2	75,7	0,29	0,36	0,33
GP Fall 3	483	137	59,2	0,28	0,12	0,20
GP Fall 4	182	246	178	1,35	0,98	1,16
GP Fall 5	318	286	246	0,90	0,77	0,84

<sup>1</sup>MF: Hautproben Mycosis fungoides Patienten, <sup>2</sup>BH: Hautproben von Patienten mit benignen Hauterkrankungen, <sup>3</sup>GH: Hautproben von gesunden Personen

<sup>4</sup>SzS: PBMC-Proben von Sézary Syndrom Patienten, <sup>5</sup>GP: PBMC-Proben von gesunden Personen

In den Spalten 2, 3 und 4 sind die abgeleiteten Transkriptzahlen der Fluoreszenz-Messungen von HMBS und hZimp10 dargestellt (mit a und b sind die beiden Dreifach-Messungen bezeichnet). Es handelt sich dabei um die Mittelwerte der jeweiligen Dreifach-Messungen.

In den Spalten 5 und 6 sind die errechneten Quotienten hZimp10 a/HMBS und hZimp10 b/HMBS aufgelistet.

Die Werte in der siebten Spalte ergeben wiederum die errechneten Mittelwerte der Quotienten beider Analysen (a und b).



#### 4. Rohdaten der Real-time PCR Analyse von FOXM1

Proben	HMBS	FoxM1 a	FoxM1 b	FoxM1a/HMBS	FoxM1b/HMBS	Mittelwert
MF Fall 1	2650	72,1	81,2	0,02721	0,03064	0,02892
MF Fall 2	1880	36,1	99,1	0,01920	0,05271	0,03596
MF Fall 3	2200	24,8	43,1	0,01127	0,01959	0,01543
MF Fall 4	1260	21,9	27,5	0,01738	0,02183	0,01960
MF Fall 5	513	7,17	13,4	0,01398	0,02612	0,02005
MF Fall 6	1490	22,4	12,3	0,01503	0,00826	0,01164
MF Fall 7	1650	33,2	25	0,02012	0,01515	0,01764
BH Fall 1	634	5,77	13,6	0,00910	0,02145	0,01528
BH Fall 2	195	3,92	1,04	0,02010	0,00533	0,01272
BH Fall 3	899	16,9	13,9	0,01880	0,01546	0,01713
BH Fall 4	1490	24,8	23,4	0,01664	0,01570	0,01617
BH Fall 5	844	61,8	71,4	0,07322	0,08460	0,07891
GH Fall 1	455	1,24	5,97	0,00273	0,01312	0,00792
GH Fall 2	1970	1,47	4,74	0,00075	0,00241	0,00158
GH Fall 3	3870	98,3	80	0,02540	0,02067	0,02304
GH Fall 4	6190	126	173	0,02036	0,02795	0,02415
GH Fall 5	5340	77,8	99,9	0,01457	0,01871	0,01664
GH Fall 6	123	0,813	1,35	0,00661	0,01098	0,00879
SzS Fall 1	183	0,0875	0,74	0,00048	0,00404	0,00226
SzS Fall 2	667	0,000559	0,965	0,00000	0,00145	0,00072
SzS Fall 3	106	23,2	45,2	0,21887	0,42642	0,32264
SzS Fall 4	68,5	56,5	129	0,82482	1,88321	1,35401
SzS Fall 5	101	25,8	70,7	0,25545	0,70000	0,47772
GP Fall 1	558	0,12	19,7	0,00022	0,03530	0,01776
GP Fall 2	209	1,23	12,5	0,00589	0,05981	0,03285
GP Fall 3	483	23,5	53	0,04865	0,10973	0,07919
GP Fall 4	182	1,22	3,58	0,00670	0,01967	0,01319
GP Fall 5	318	2,27	4,1	0,00714	0,01289	0,01002

<sup>1</sup>MF: Hautproben Mycosis fungoides Patienten, <sup>2</sup>BH: Hautproben von Patienten mit benignen Hauterkrankungen, <sup>3</sup>GH: Hautproben von gesunden Personen

<sup>4</sup>SzS: PBMC-Proben von Sézary Syndrom Patienten, <sup>5</sup>GP: PBMC-Proben von gesunden Personen

In den Spalten 2, 3 und 4 sind die abgeleiteten Transkriptzahlen der Fluoreszenz-Messungen von HMBS und FOXM1 dargestellt (mit a und b sind die beiden Dreifach-Messungen). Es handelt sich dabei um die Mittelwerte der jeweiligen Dreifach-Messungen.

In den Spalten 5 und 6 sind die errechneten Quotienten FOXM1 a/HMBS und FOXM1 b/HMBS aufgelistet.

Die Werte in der siebten Spalte ergeben wiederum die errechneten Mittelwerte aus den Quotienten beider Analysen (a und b).